



**Aalto-yliopisto**  
Kemian tekniikan  
korkeakoulu

**Kemian tekniikan korkeakoulu**  
**Kemian tekniikan tutkinto-ohjelma**

**Maija Lähteenmäki**

**HAPEN DIFFUUSIO EMULSIOIDEN ÖLJY/VESI-RAJAPINNOISSA**

**Diplomityö, joka on jätetty opinnäytteenä tarkastettavaksi diplomi-  
insinöörin tutkintoa varten Espoossa 27.3.2013.**

**Valvoja**

**Professori Simo Laakso**

**Ohjaajat**

**Tekniikan tohtori Pirkko Forssell**  
**Tekniikan tohtori Riitta Partanen**

---

**Tekijä** Maija Lähteenmäki

---

**Työn nimi** Hapen diffuusio emulsion öljy/vesi-rajapinnoissa

---

**Laitos** Kemian tekniikan koulutusohjelma

---

**Professuuri** Soveltava biokemia

---

**Professuurikoodi** Kem-30

---

**Työn valvoja** Professori Simo Laakso

---

**Työn ohjaajat** Tekniikan tohtori Pirkko Forssell ja tekniikan tohtori Riitta Partanen

---

**Päivämäärä** 27.03.2013

---

**Sivumäärä** 81 + 2

---

**Kieli** Suomi

---

### Tiivistelmä

Öljyn hapettuminen emulsiossa aiheuttaa ravinteiden määrän vähenemistä, haitallisten reaktiotuotteiden syntyä, ulkonäön ja rakenteen heikkenemistä sekä säilyvyysajan lyhenemistä. Hapettumisen hallitsemiseksi olisi tärkeää tunnistaa emulsion rajapinnan merkitys hapen diffuusion hidastajana. Tutkimalla rajapinnan läpi tapahtuvaa hapen aineensiirtoa voidaan saada käsitys hapen aineensiirron merkityksestä öljyn hapetusreaktion käynnistymiseen ja erilaisten rajapintojen merkitys hapettumisen hillitsemiseen.

Työn kokeellisessa osassa pystytettiin fluoresenssin sammumiseen perustuva menetelmä hapen diffuusiokertoimen määrittämiseksi. Mittausmenetelmässä fluoresenssin sammuminen on suoraan verrannollinen öljypisaran sisään diffundoituneen hapen pitoisuuteen. Työssä tutkittiin 14 erilaisen emulgaattorin (kaseiini-, hera-, pektiini-, ristisilloitettu kaseiini-, arabikumi-, viiden erilaisen kaseiinia ja pektiiniä sisältävän monikerrosemulsion, SDS-, Tween80-, HiCap- ja hydrofobiini-emulsion) potentiaalisuutta rajoittaa hapen diffuusiota öljy/vesi-rajapinnan läpi. Emulsiot valmistettiin korkeapainehomogenisaattorilla ja öljynä käytettiin rypsi-öljyä. Työssä määritettiin hapen diffuusiokerroin eri emulsioissa kolmella erilaisella matemaattisella mallilla. Kaksi ensimmäistä mallia perustuivat Fickin toiseen lakiin, jossa diffuusio määritettiin pallon muotoiselle kappaleelle. Ensimmäinen näistä mallinsi hapen diffuusiota emulsiorajapinnan kuoresta öljypisaran keskipisteeseen ja toinen kuvasi rajapinnan läpi tapahtuvan hapen diffuusiota. Kolmas malli perustui hapen diffuusion nestefaasissa.

Kahdella ensimmäisellä mallilla määritetyt hapen diffuusiokertoimet olivat kirjallisuuteen verrattuna hyvin pieniä (noin  $10 \cdot 10^{-15} \text{ cm}^2/\text{s}$ ). Mallilla kolme hapen diffuusiokertoimeksi erilaisissa emulsioissa saatiin  $1\text{--}4 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$ . Tuloksen perusteella tehtiin johtopäätös, että menetelmä mittasi hapen diffuusiota liuoksessa eikä rajapinnalla. Rajapinnalla tapahtuva hapen diffuusion määrittäminen ei onnistunut pystytetyllä menetelmällä, sillä se tapahtui määritysmenetelmän mittaussykyyn nähden liian nopeasti.

---

**Avainsanat** Öljy vesi –emulsio, rajapinta, emulgaattori, diffuusio, hapen diffuusiokerroin

---

---

**Author** Maija Lähteenmäki

---

**Title of thesis** Oxygen transport across interfaces in oil-water emulsions

---

**Department** Degree Programme of Chemical Technology

---

**Professorship** Applied Biochemistry

---

**Code of professorship** Kem-30

---

**Thesis supervisor** Professor Simo Laakso

---

**Thesis advisors** D.Sc. (Tech) Pirkko Forssell & D.Sc. (Tech) Riitta Partanen

---

**Date** 27.03.2013

---

**Number of pages** 81 + 2

---

**Language** Finnish

---

## Abstract

Oxidation of edible oils is a major cause in deterioration of the quality of food. Oxidation can lead to the development of off-flavours and toxic compounds. Engineering the interface of oil-in-water emulsion droplets with different kinds of surface-active materials that modify the permeability of the interface could provide a technique to reduce oxidation of susceptible lipids. Developing a method to measure diffusion of oxygen across interfaces could provide a way to screen effectively the barrier properties of different kinds of interfaces.

In the experimental part of this thesis, a real-time measurement method to measure oxygen transport across an oil-water emulsion interface was set up. The method was based on a concentration dependent fluorescence quenching upon interaction with oxygen. Oxygen diffusion in 14 different emulsions was studied: casein, whey, pectin, gum arabic, cross-linked casein, casein-pectin multilayer emulsions (five different kinds), sodium-dodecyl sulphate (SDS), Tween80, modified starch (HiCap) and hydrophobin emulsion. Emulsions were prepared with ultra-high pressure homogenization technology and rapeseed oil was used as an oil phase. The diffusion coefficient of oxygen across interface was calculated based on two different mathematic models. Models one and two were based on Fick's second law as applied for a sphere. Model three described oxygen diffusion in a semi-infinite media.

Determining the diffusion coefficients, models one and two generated very small oxygen diffusion coefficients (about  $10 \cdot 10^{-15} \text{ cm}^2/\text{s}$ ). For model three, however, the oxygen diffusion coefficient was around  $1\text{--}4 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$ . According to the literature, in water oxygen diffusion coefficient is about  $2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  and in a gelatin films around  $2 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ . The results achieved indicated that the measurement method determined oxygen diffusion in the solution, not in the interface. The oxygen diffusion across the interface did not affect the results due to its rapid speed.

---

**Keywords** Oil in water emulsion, interface, emulsifier, diffusion, oxygen diffusion coefficient

---

## ESIPUHE

Diplomityö on kirjoitettu ja sen kokeellinen osa on suoritettu Teknologian tutkimuskeskuksessa (VTT) Bioprosessointi-yksikössä nanobiomateriaalit-tiimissä (TK4047) ajalla 1.9.2012–3.3.2013. Työ on osa Suomen Akatemian rahoittamaa projektia, jonka tavoitteena on kehittää elintarvikkeisiin helposti lisättäviä, hapettumiselta suojattuja omega-rasvahappoja jauhemaisessa muodossa.

Työn ohjasivat tekniikan tohtorit Pirkko Forssell ja Riitta Partanen. Työn valvojana toimi professori Simo Laakso. Tahdon kiittää ohjaajiani Pirkkoa ja Riittaa työn ohjaamisesta, yhteiset palaverit saivat työhön aina uusia näkökulmia mietittäviksi. Simoa haluan kiittää yhteisistä työpalavereista ja työn valvomisesta. Haluan kiittää myös suuresti tekniikan tohtori Outi Toikkasta ja tekniikan tohtori Lasse Murtomäkeä (Aalto-yliopisto) matemaattisten diffuusiomallien soveltamisesta työhön. Ilman Lassen ja Outin apua tulosten laskennallinen osuus olisi jäänyt hyvin puutteelliseksi. Haluan kiittää myös Timo Moisiota opastuksesta laboratoriotyöskentelyyn ja avusta menetelmän pystytysvaiheessa sekä yleisestä tuesta työn teon aikana. Lisäksi haluan kiittää teknisiä tutkimusavustajia Päivi Matikaista ja Heljä Heikkistä kaikesta avusta laboratoriotyöskentelyssä. Kiitos myös koko TK4047-tiimille kannustuksesta ja kaikesta saamastani avusta.

Espoossa 27. maaliskuuta 2013,



Maija Lähteenmäki



## SISÄLLYSLUETTELO

1	Johdanto.....	1
	KIRJALLISUUSOSA.....	4
2	Emulsiot.....	4
2.1	Emulsion ominaisuudet.....	4
2.2	Emulsion valmistus.....	5
3	Emulgaattorit .....	8
3.1	Proteiinit emulgaattoreina .....	9
3.1.1	Kaseiini .....	11
3.1.2	Heraproteiini .....	12
3.1.3	Hydrofobiini .....	12
3.2	Polysakkaridit emulgaattoreina .....	13
3.2.1	Arabikumi.....	13
3.2.2	Pektiini .....	14
3.2.3	Täkkelyksen oktenyyilisukkinaatti-johdannainen .....	15
4	Emulsiorajapinnan muokkaus.....	15
4.1	Rajapinnan proteiinien ristosilloittaminen .....	16
4.2	Rajapintojen monikerrostaminen.....	17
5	Aineensiirto ja aineensiirron mittaaminen emulsioissa .....	19
5.1	Diffuusio emulsiossa .....	19
5.1.1	Diffuusio jatkuvassa ja dispergoidussa faasissa .....	22
5.1.2	Diffuusio rajapinnan läpi.....	23
5.2	Rajapinnan läpi tapahtuvan aineensiirron mittaaminen .....	23
5.2.1	Hapen diffuusion mittaaminen emulsiorajapinnan läpi.....	24
5.2.2	Vapaiden radikaalien määrittäminen öljyfaasista .....	27
6	Emulsion stabiilisuus.....	27
6.1	Fysikaalinen stabiilisuus .....	27
6.2	Kemiallinen stabiilisuus.....	28
6.2.1	Primääriset hapettumistuotteet.....	32
6.2.2	Sekundääriset hapettumistuotteet.....	33

KOKEELLINEN OSUUS .....	34
7 Materiaalit ja menetelmät .....	35
7.1 Materiaalit .....	35
7.2 Menetelmät.....	36
7.2.1 Emulgaattoriliuoksen valmistus.....	36
7.2.2 Emulsion valmistus .....	37
7.2.3 Emulsion typetys .....	38
7.2.4 Fluoresenssin mittaus .....	39
7.2.5 Pisarakoon määrittäminen .....	40
7.2.6 Data-analyysit .....	41
8 Tulokset ja tulosten tarkastelu .....	47
8.1 Typetysajan vaikutus fluoresenssitason .....	47
8.2 Emulsion pisarakoko ja stabiilisuus typetyksen aikana .....	49
8.3 Fluoresenssimittauksen näytämäärän vaikutus fluoresenssitason .....	52
8.4 Sekoituksen vaikutus fluoresenssimittaukseen.....	54
8.5 Rajapintojen vaikutus fluoresenssin sammumiseen .....	57
8.6 Hapen diffuusiokertoimen määrittäminen mallilla 1 .....	63
8.7 Hapen diffuusiokertoimen määrittäminen mallilla 2 .....	65
8.8 Hapen diffuusiokertoimen määrittäminen mallilla 3 .....	68
9 Johtopäätökset.....	71
10 Lähteet .....	75

## LIITTEET

Liite 1. Emulsion typetysajan vaikutus keskihajontojen keskiarvoon

Liite 2. Typetyksen vaikutus emulsion haihtumiseen tunnin typetyksen aikana

## 1 Johdanto

Ravintona nautittavat öljyt ja rasvat esiintyvät elintarvikkeissa yleensä emulsiosysteemeinä. Esimerkiksi maidossa rasva on dispergoitunut veteen ja voissa vesi on dispergoitunut rasvaan. Etenkin tyydyttymättömien rasvahappojen lisääminen emulsioihin on elintarviketeollisuudessa yhä suositumpaa, sillä tyydyttymättömillä rasvahapoilla on monia terveydelle suotuisia ominaisuuksia. Elimistölle välttämättömiä tyydyttymättömiä rasvahappoja ovat alfa-linoleenihappo, joka on omega-3-rasvahappo sekä linolihappona tunnettu omega-6-rasvahappo. Näitä rasvahappoja elimistö ei pysty itse syntetisoimaan, minkä vuoksi ne on saatava ravinnosta. Nämä monitydyttymättömät rasvahapot toimivat muun muassa hermoverkoston ja verisuoniston rakennusaineina (SanGiovanni ja Chew, 2005). Tyydyttymättömien rasvahappojen herkkä hapettuminen emulsioissa on kuitenkin suuri haaste, sillä hapettuminen aiheuttaa elintarvikkeeseen fysikaalista ja kemiallista laadun heikkenemistä. Laadun heikkeneminen johtaa säilyvyysajan lyhenemiseen, ravinteiden määrän vähenemiseen, haitallisten reaktiotuotteiden kuten aldehydien ja ketonien syntyyn sekä ulkonäön ja rakenteen heikkenemiseen. Emulsion hapettumisherkkyteen vaikuttaa muun muassa emulsion molekulaarinen ympäristö sekä emulsion öljypisaroiden vuorovaikutukset antioksidanttien ja pro-oksidanttien kanssa. Emulsioiden hapettumista on pyritty hillitsemään esimerkiksi antioksidanttien lisäyksellä sekä emulsion rajapinnan muokkaamisella muun muassa rajapinnan koostumuksen, paksuuden ja varauksen suhteen. Viime vuosina on arveltu, että ymmärtämällä paremmin rajapinnan läpi tapahtuva aineensiirto, voitaisiin kehittää yhä stabiilimpia emulsioita hapettumista vastaan (Waharo *et al.*, 2010a).

Elintarviketeollisuudessa on yhä kasvava tarve korvata ruuan synteettiset lisäaineet luonnollisilla vaihtoehdoilla. Proteiinit kykenevät toimimaan ruuan luonnollisina lisäaineina tuoden elintarvikkeisiin muun muassa enemmän rakennetta ja / tai antioksidatiivista luonnetta. Lisäksi proteiineilla on GRAS-status (*Generally recognised as safe*, GRAS). Emulsion muodostuksessa proteiinit ovat mahdollinen vaihtoehto synteettisille emulgaattoreille, sillä useimmat proteiinit ovat myös

amfifiilisiä, jolloin ne hakeutuvat emulsion öljy/vesi-rajapinnoille stabiloiden emulsiota. Lisäksi proteiineilla on havaittu antioksidatiivisia vaikutuksia. Biopolymeerit joilla on emulgaattorimaisia ominaisuuksia poikkeavat toisistaan muodostamiensa rajapintojen suhteen. Vertailemalla erilaisten biopolymeerien rajapintaominaisuuksia voidaan saada käsitys niiden merkityksestä emulsion hapettumisherkkyyteen (Waharo *et al.*, 2010a).

Happi ja siirtymämetallit ovat emulsioissa päätekijöitä hapettumisreaktioiden aloittamiseen (Tikekar *et al.*, 2011). Emulsiossa tapahtuvaa hapen aineensiirron kvantitatiivista ymmärtämistä tarvitaan erityisesti siksi, että opittaisiin tuntemaan emulgaattoreiden rajapinnan vaikutus emulsion hapettumiseen ja täten hallitsemaan sitä. Emulsion rajapintaominaisuuksien tutkimiseen on käytetty pääasiassa epäsuoria mittausmenetelmiä, jotka perustuvat lähinnä öljypisaran ulkopuolella tapahtuvien muutosten mittauksiin, kuten esimerkiksi hapen kulutuksen mittaukseen (Berton *et al.*, 2011; Villiere *et al.*, 2005) tai haihtuvien yhdisteiden syntyyn kaasufaasissa (Berton *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2003; Horn *et al.*, 2012). Emulsion rajapinnan roolin selvittämiseksi olisi kuitenkin tärkeää kehittää reaaliaikainen mittausmenetelmä rajapinnan läpi tapahtuvaan diffuusion mittaamiseen, jotta erilaisten rajapintojen läpäisevyysominaisuuksia voitaisiin vertailla *in situ*.

Työn teoriaosuus käsittelee työn kokeellisen osuuden kannalta tärkeitä osa-alueita työn aiheen perustelemiseksi. Teoriaosuuden on tarkoitus antaa kuva emulsion rakenteesta ja sen valmistuksesta, sekä rajapinnan merkityksestä sen läpi tapahtuvaan aineensiirtoon. Lisäksi käsitellään keinoja muokata emulgaattorirajapintaa mahdollisimman tiivisrakenteiseksi, estämään aineensiirtoa rajapinnan läpi. Viimeisenä teoriaosuudessa käsitellään emulsion stabiilisuuden heikkenemiseen johtavia syitä.

Työn kokeellisen osan tavoitteena oli pystyttää reaaliaikainen *in-situ*-mittausmenetelmä emulsion rajapinnan läpi kulkeutuvan hapen diffuusiokertoimen määrittämiseksi (Tikekar *et al.*, 2011). Reaaliaikainen mittausmenetelmä toteutettiin ruteniumpohjaisen öljyliukoisen fluoresoivan väriaineen avulla. Fluoresoiva väriaine



mahdollisti happisensitiivisen ja reversiibelin fluoresenssin mittauksen. Mittausmenetelmän avulla oli tavoitteena vertailla erilaisten emulgaattoreiden muodostamien rajapintojen kykyä läpäistä happea. Hapen diffuusiokertoimet erilaisten rajapintojen läpi määritettiin kahdella erilaisella matemaattisella mallilla. Lisäksi määritettiin hapen lineaarinen diffuusio emulsion jatkuvassa faasissa emulsion pinnalta pohjalle.

## KIRJALLISUUSOSA

### 2 Emulsiot

#### 2.1 Emulsion ominaisuudet

Emulsiot koostuvat tyypillisesti kahdesta toisiinsa liukenemattomasta nesteestä, esimerkiksi vedestä ja öljystä. Emulsiossa sisäfaasi on dispergoitunut pieninä pisaroina ulkofaasiin eli jatkuvaan faasiin. Tavallisesti emulsiot luokitellaan jatkuvan ja dispergoituneen faasin perusteella kahteen ryhmään. Öljy vedessä -emulsiossa (*oil in water*, O/W) öljy tai rasva on dispergoitunut pieninä pisaroina vesifaasiin, esimerkkinä maito ja kerma. Vesi öljyssä -emulsiossa vesi taas on pieninä pisaroina öljy-/rasva-faasin seassa, esimerkiksi voissa (McClements, 1999). Elintarvikkeissa öljy vedessä -emulsiot ovat tyypillisimpiä, jonka vuoksi työssä keskitytään O/W-emulsioiden ominaisuuksiin.

Emulsio on mahdollista valmistaa homogenoimalla vain vettä ja öljyä, mutta tällainen emulsio on hyvin epästabiili. Emulsio saadaan fysikaalisesti stabiilimmaksi lisäämällä siihen emulgaattoria. Pisaroilla on nimittäin taipumus hakeutua termodynaamisesti stabiilimpaan tilaan ja yhdistyä suuremmiksi pisaroiksi pinta-alan minimoimiseksi, joka aiheuttaa lopulta faasien erottumisen. Tiheydeltään pienempi öljyfaasi nousee tällaisissa seoksissa vesifaasin pinnalle hajottaen lopulta emulsion rakenteen.

Emulgaattorit ovat pinta-aktiivisia molekyylejä, jotka adsorboituvat homogeenoinnin aikana juuri muodostuneiden pisaroiden pinnalle. Emulgaattorin adsorboituminen muodostaa öljypisaran pinnalle suojaavan membraanin, joka madaltaa rajapinnan jännitystä sekä estää pisaroiden keskinäisiä kontakteja. Emulsio voidaan jakaa rakenteellisesti kolmeen osaan: pisaran sisäfaasiin eli öljyfaasiin, pisaraa

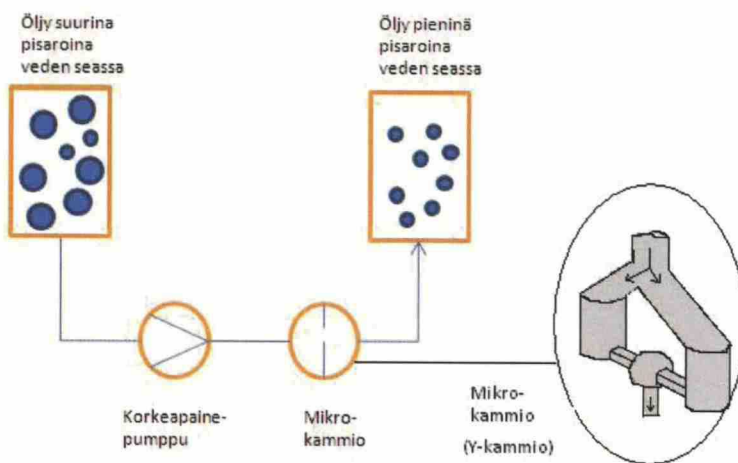
ympäröivään faasiin eli jatkuvaan faasiin sekä näiden kahden faasin rajapintaan (*interface*). Emulsion ei-polaariset molekyylit sijaitsevat öljyfaasissa, polaariset molekyylit vesifaasissa ja amfifiiliset molekyylit rajapinnalla. Emulgaattorit ovat amfifiilisiä molekyylejä, jotka omaavat polaarisen ja ei-polaarisen alueen tai hydrofobisen ja hydrofiilisen alueen, joiden avulla ne kykenevät laskemaan rajapinnan jännitystä (McClements, 1999). Emulgaattoreita käsitellään tarkemmin luvussa 3.

## 2.2 Emulsion valmistus

Emulsion valmistusta kutsutaan homogenoinniksi. Homogenoinnissa öljypisarat dispergoidaan pieniksi pisaroiksi veden sekaan. Ennen emulsion homogenointia emulsion vesiliukoiset ainesosat kuten proteiinit, sokerit ja suolat liuotetaan vesifaasiin ja öljyliukoiset komponentit kuten vitamiinit ja antioksidantit öljyfaasiin. Etenkin vesifaasiin liuotettavien proteiinien tulisi antaa liueta kunnolla, sillä proteiinien liukenemisella on vaikutusta niiden kykyyn toimia emulgaattoreina. Homogenointi voidaan suorittaa suorahomogenoinnilla tai kaksivaiheisella homogenoinnilla. Suorassa homogenoinnissa emulsio valmistetaan yhdessä vaiheessa kahdesta erillisestä faasista. Kaksivaiheisessa homogenoinnissa faasit sekoitetaan toisiinsa esihomogenoinnilla ja seuraavassa vaiheessa rasvapisarat pilkotaan edelleen pienimmiksi. Stabiilin emulsion aikaansaamiseksi emulsion valmistuksessa on mielekästä käyttää kaksivaiheista homogenointia, jotta aineet saadaan kunnolla sekaisin. Useimmiten kaksivaiheisella homogenoinnilla saadaan myös aikaiseksi pisarakooltaan pienempiä emulsioita. Homogenointiin on olemassa monia erilaisia laitteistoja kuten tehosekoittimia, kolloidisia myllyjä, korkeapainehomogenisaattoreita ja ultraäänihomogenisaattoreita (sonikaattori) (McClements, 1999). Työssä keskitytään jatkossa korkeapainehomogenisaattorin (*high pressure homogenizer*, HPH) toimintaan.

HPH koostuu korkeapainepumpusta ja korkeapaineisesta erotusyksiköstä. HPH:t ovat yleisiä elintarvike-emulsioiden valmistuksessa, sillä ne tarjoavat emulsiolle hyvän stabiilisuuden ja rakenteen (Kuhn ja Cunha, 2012). Kuvassa 1 on esitetty HPH:n toimintaperiaate. Emulsio syötetään HPH:lle korkean paineen avulla. Paineen

avulla emulsio saadaan työnnettyä mikrokammioihin, joissa kaksi näytevirtaa törmäytetään toisiinsa ja emulsio altistuu paineen alenemiselle, turbulentialle virtaukselle ja kavitaatiolle. HPH:ssa on yleensä käytössä kaksi mikrokammiota, pienen pisarakoon varmistamiseksi (Kluge *et al*, 2012). Pääkammion mikrokanavan koko on apukammion mikrokanavan kokoa pienempi. Apukammion tarkoitus on lähinnä lisätä vastapainetta, joka parantaa homogenisaattorin tehokkuutta ja kammioden elinikää. Homogenointikammioden rakenne vaihtelee kammioden valmistajan ja halutun pisarakoon mukaan. Pääkammiot voivat olla Y-muotoisia kammioita, joissa nestevirta eriytetään kahdeksi virraksi jonka jälkeen ne törmäytetään toisiinsa korkealla paineella. Apukammiot voivat olla Z-muotoisia kammioita, joissa nestevirta syötetään kammioon kohtisuorasti, ajatetaan mikrokammion läpi ja poistetaan kammioista taas kohtisuorasti mikrokammioon nähden (Anon., 2008).



Kuva 1. Korkeapainehomogenisaattorin toimintaperiaate. Yleensä jo esihomogenoitu emulsio syötetään korkeapainepumpun kautta mikrokammioihin Y ja Z (Y-kammio = pääkammio, Z-kammio = jälkikammio, ei kuvassa), joissa öljystä muodostuu pienen pisarakoon pisaroita, emulgaattorin kiinnittyessä muodostuneiden öljypisaroiden päälle, vähentämään faasien välistä pintajännitystä (Kluge *et al*, 2012, muokattu; Anon., 2008, muokattu).

Emulsiot voidaan luokitella pisarakoon mukaan makro-, mikro- ja nanoemulsioihin. Makroemulsioissa pisarakoko vaihtelee 0,1 – 100  $\mu\text{m}$ :n välissä. Makroemulsioissa pisarakoko sallii valon siroamisen ja tekee emulsion läpinäkyvämmäksi. Mikroemulsiot koostuvat makroemulsioita pienemmistä pisaroista (10–100 nm),



jonka vuoksi emulsio on stabiilimpi ja silmin nähden läpinäkyvä tai läpikuultava. Emulsion stabiilisuus saavutetaan hyvin pienellä pisarakoolla ja matalalla rajapinnan pintajännityksellä. Nanoemulsioiden pisarakoko on mikroemulsion pisarakokoa pienempi, nanoemulsioiden pisarakoon vaihdellessa lähteen mukaan 1-800 nm välillä (Bouyer *et al.*, 2012).

Homogenoinnin aikana syntyneiden öljypisaroiden koko vaikuttaa ratkaisevasti emulsion stabiilisuuteen, ulkonäköön ja rakenteeseen. Pisarakokoon voidaan vaikuttaa homogenoinnin aikana muun muassa homogenisaattorin teholla, lämpötilalla, emulgaattorin konsentraatiolla tai valitsemalla mahdollisimman tehokas emulgaattori. Emulsion valmistamiseen tarvitaan energiaa, jotta öljypisarat saadaan dispergoitua mahdollisimman pieniksi veden sekaan. Homogenisaattorin teho vaikuttaa syntyneeseen pisarakokoon ja tehoa voidaan parantaa korkeapainehomogenisaattorissa nostamalla homogenointipainetta tai kasvattamalla homogenointiaikaa (McClements, 1999). Kuhn ja Cunha (2012) havaitsivat, että paineen ja kierrätyskertojen liiallinen kasvattaminen korkeapainehomogenoinnissa voi johtaa pisaroiden koalesenssiin ja molekyylimassaltaan suurempien proteiinirykelmien kehittymiseen. Esimerkiksi paineen kasvattaminen 20 MPa:sta 80 MPa:iin ja kierrätyskertojen kasvattaminen yli kolmeen johti pisarakooltaan suurempiin emulsioihin. Emulsion rakenteen heikkeneminen rajummissa homogenointikäsitelyissä voidaan selittää leikkausvoimien kasvulla ja lämpötilan nousulla, jotka laskevat emulgointikapasiteettia. Korkea lämpötila voi denaturoida emulgaattoreina käytettävät proteiinit, mikä aiheuttaa proteiinien reaktiivisten ryhmien aktivoitumisen ja proteiinien vuorovaikutusten lisääntymisen. Tämä johtaa lisääntyneeseen flokkulaatioon. Tämän vuoksi jokaiselle emulsiotyypille tulisi määrittää optimaaliset homogenointiparametrit stabiilin emulsion aikaansaamiseksi (Kuhn ja Cunha, 2012).

### 3 Emulgaattorit

Emulgaattorit ovat pinta-aktiivisia aineita, joilla on taipumus hakeutua kahden faasin rajapinnalle. Emulgaattorit kykenevät muodostamaan rajapinnalle normaalisti noin 2 nm - 20 nm paksuisen kerroksen, riippuen emulgaattorista (McClements ja Weiss, 2005). Emulgaattorit kykenevät pinta-aktiivisten ominaisuuksiensa vuoksi adsorboitumaan homogeenoinnissa juuri syntyneen pienen öljypisaran pinnalle, laskemaan faasien välistä rajapinnan jännitystä ja täten stabiloimaan emulsiota. Emulsion pisarakoko on riippuvainen siitä, kuinka nopeasti emulgaattori kykenee adsorboitumaan pisaran pintaan. Mitä hitaampaa adsorboituminen on tai mitä pienempi emulgaattorin konsentraatio emulsiossa on, sitä enemmän pisarat ehtivät törmäillä toisiinsa ja muodostaa isompia pisaroita. Erilaisilla emulgaattoreilla voidaan valmistaa stabiilisuuksiltaan ja käyttöominaisuuksiltaan erilaisia emulsioita (Dickinson, 2009).

Emulgaattoreina voivat toimia muun muassa pienimolekyyliset pinta-aktiiviset aineet (*surfactants*), biopolymeerit kuten proteiinit, polysakkaridit sekä kolloidiset partikkelit. Synteettisillä pinta-aktiivisilla emulgaattoreilla on hydrofiilinen pää ja lipofiilinen häntä, jotka mahdollistavat rajapinnalle tarttumisen ja rajapinnan pintajännityksen laskun. Tämän vuoksi synteettiset pinta-aktiiviset aineet kykenevät pakkautumaan tiiviisti rajapinnalle ja estämään öljypisaran kontakteja keskenään. Niiden pieni koko ja molekyylipaino mahdollistaa myös sen, että ne diffundoituvat ja adsorboituvat rajapintaan biopolymeeripohjaisia emulgaattoreita nopeammin. Pienet pinta-aktiiviset aineet saavuttavat termodynaamisen tasapainon rajapinnalla sekunneissa (McClements, 1999). Synteettiset pinta-aktiiviset aineet kykenevät laskemaan öljy/vesi-rajapinnan pintajännitystä noin 30–40 mN/m (Bouyer *et al.*, 2012). Suosittuja synteettisiä pinta-aktiivisia aineita ovat muun muassa Tween 20 ja Tween 80 (polysorbaatti 20 ja 80) (Berton *et al.*, 2011) sekä natriumlauryylisulfaatti (*Sodium dodecyl sulfate*, SDS) (Waharo *et al.*, 2010a). Synteettiset pinta-aktiiviset aineet kykenevät muodostamaan noin 0,5-1 nm:n paksuisia rajapintoja (Berton *et al.*, 2012). Seuraavaksi keskitytään kuitenkin biopolymeeripohjaisiin emulgaattoreihin,

niiden soveltuessa erityisen hyvin elintarviketeollisuuden vaatimuksiin luonnollisista emulgaattoreista (Waharo *et al.*, 2010a).

### 3.1 Proteiinit emulgaattoreina

Proteiinit ovat luonnon emulgaattoreita, joita käytetään elintarviketeollisuudessa niiden ravitsemuksellisten ja fysikaalisten ominaisuuksien ansiosta. Monilla proteiineilla on kyky toimia emulgaattoreina, sillä ne kykenevät adsorboitumaan öljy/vesi-rajapintaan (Bouyer *et al.*, 2012). Proteiinien rakenteessa ei kuitenkaan ole yhtä selkeää hydrofiilistä ja -fobista rakennetta kuin synteettisillä pinta-aktiivisilla aineilla. Proteiinien emulgointiominaisuudet ilmenevät proteiinien rakenteessa olevien poolittomien aminohappojen seurauksena. Nämä poolittomat ryhmät pyrkivät järjestäytymään niin, että ne ovat mahdollisimman vähäisessä kontaktissa polaarisen veden kanssa. Tällöin proteiinin poolittomat aminohapporyhmät järjestäytyvät tiiviimmäksi rakenteeksi proteiinin sisäpuolelle, kun taas polaariset aminohapot muodostavat ”kuoren” polaarittoman rakenteen päälle kontaktiin veden kanssa (McClements, 1999). Tämä proteiinien orientoituminen vähentää rajapinnan jännitystä ja lisää emulsion stabiilisuutta (Raikos, 2009). Proteiinit kykenevät laskemaan öljy/vesi-rajapinnan pintajännitystä noin 15–20 mN/m. Vaikka proteiinien kyky laskea pintajännitystä on synteettisiä pinta-aktiivisia aineita heikompi, proteiinit luovat kuitenkin termodynaamisesti ja kineettisesti hyvin stabiilin emulsion (Bouyer *et al.*, 2012). Proteiinit adsorboituvat rajapinnalle niin kauan, kunnes rajapinta on saturoitunut proteiineilla. Rajapintoihin adsorboitumattomat proteiinit jäävät vapaiksi emulsion jatkuvaan vesifaasiin. Tutkimuksissa on havaittu, että myös näillä proteiineilla on vaikutus emulsion stabiilisuuteen. Jatkuvaan faasissa olevien proteiinien on nimittäin todettu toimivan antioksidanteina. Proteiinit kykenevät sitomaan kationisia siirtymämetalleja itseensä, joka estää niiden pääsyn öljyfaasiin edistämään hapetuksen kulkua (Waharo *et al.*, 2010a).

Proteiinit voivat hidastaa emulsion hapettumista vähentämällä vapaiden radikaalien vuorovaikutuksia öljyfaasin kanssa ja muodostamalla emulsioon paksuja rajapintoja (Waharo *et al.*, 2010b). Tyypillisimmin proteiinistabiloiduissa emulsioissa käytetään 1–3 % proteiinipitoisuutta (Damodaran, 2005; Tikekar *et al.*, 2011). Proteiinin kyky



adsorboitua öljy/vesi-rajapinnalle on hyvin riippuvainen proteiinin fysikokemiallisista ominaisuuksista. Erilaisilla proteiineilla on erilaiset jakaumat polaarittomia ja polaarisia aminohapporyhmiä, mikä selittää proteiinien erilaiset adsorboitumisominaisuudet (Damodaran, 2005).

Proteiinin aminohapot ovat vastuussa proteiinin varauksien muodostumisesta. Aminohapot voivat siis koostua positiivisesti varautuneista ioneista (esim.  $\text{NH}_3^+$ ) ja negatiivisesti varautuneista ioneista (esim.  $\text{COO}^-$ ). Molekyylin kokonaisvaraus riippuu ionisoituneiden ryhmien pK-arvoista sekä jatkuvan faasin pH:sta. Mikäli proteiini sisältää paljon saman varauksen omaavia aminohapporyhmiä, proteiinilla on todennäköisimmin melko levittäytynyt rakenne, jotta varausten etäisyys olisi mahdollisimman suuri. Tällöin epäsuotuisat elektrostaattiset voimat saadaan minimoitua. Mikäli proteiinin aminohapoissa taas on paljon vastakkaissuuntaisia varauksia, proteiinin rakenne on todennäköisimmin melko tiivis, mikä maksimoi suotuisia elektrostaattisia voimia. Tämän vuoksi proteiinit ovat rakenteeltaan rajapinnalla hyvin tiiviitä isoelektrisen pisteen lähetyvillä (positiivisia ja negatiivisia varauksia on yhtä suuri määrä) ja levittävät rakennettaan pH:ta muutettaessa (Dickinson, 2009).

Hyvän proteiini-emulgaattorin tulee adsorboitua rajapintaan nopeasti ja tasaisesti. Lisäksi proteiinin tulee muodostaa rajapintaan kalvo molekyylien välisillä vuorovaikutuksilla (Damodaran, 2005). Proteiini-emulgaattorit ovat anionisia eli varaukseltaan negatiivisia emulsion pH:n ollessa pI-arvoa korkeammalla (Anton ja Gardemer, 1999). Proteiinit toimivat tällöin kationisten siirtymämetallien sitoijina (Waharo *et al.*, 2010a). Vaikka proteiinien käyttö emulgaattoreina on kasvanut, niiden emulgointiominaisuudet eivät ole yhtä hyvät verrattuna synteettisiin pinta-aktiivisiin aineisiin (Berton *et al.*, 2011, Berton *et al.*, 2012). Tämän vuoksi proteiinien emulgointiominaisuuksia on pyritty kehittämään erilaisin keinoin, muun muassa proteiinien ristosilloituksella ja kerrostustekniikalla. Proteiinien ominaisuuksien muokkaamista on käsitelty tarkemmin luvussa 4. Seuraavaksi esitellään erilaisia proteiiniemulgaattoreita.



### 3.1.1 Kaseiini

Kaseiini on maidon pääproteiini ja perusteellisesti tutkittu emulgaattori (Bouyer *et al.*, 2012). Emulsioiden stabiloimiseen kaseiinia käytetään useimmiten natriumkaseinaatin muodossa. Natriumkaseinaatti sisältää neljää eri kaseiiniproteiinia:  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - ja  $\kappa$ -kaseiinia. Kaseiinin monomeeristen muotojen molekyylipaino on melko matala (15000-26000 Da), mutta luonnossa kaseiini esiintyy heterogeenisissä miselleissä.  $\beta$ -kaseiini ja  $\alpha_{s1}$ -kaseiini muodostavat kolme neljäsosaa koko kaseiiniproteiinista ja ovat samalla myös päävastuussa kaseiinin hyvistä emulgointiominaisuuksista. Kaseiinin on rakenteeltaan huomattavan hydrofobinen, mikä edesauttaa sen nopeaa adsorboitumista rajapinnalle. Tämä mahdollistaa paksun kerroksen syntymisen öljypisaran päälle, mikä estää öljypisaroiden koalesenssiä ja flokkulaatiota. Kaseiini muodostaa noin 10 nm paksuisia rajapintoja (Hu *et al.*, 2003). Kaseiinin isoelektrinen piste (pI) on noin 4,6-4,8. Kaseiinin rakenteessa ei esiinny disulfidisiltoja, jonka vuoksi proteiinilla on vain vähän sekundääristä ja tertiääristä luonnetta. Tästä syystä kaseiini muodostaa melko lämpöstabiiilin proteiinin (Elzoghby *et al.*, 2011).

Vertailtaessa heraproteiini-isolaattia, natriumkaseinaattia ja soija-proteiini-isolaattia emulgaattoreina, havaittiin natriumkaseinaatti-emulsio kaikkein reaktiivisimmaksi pro-oksianttien suhteen ja täten parhaimmaksi emulgaattoriksi estämään öljyn hapettumista (Faraji *et al.* 2004). Natriumkaseinaatin hyvä emulgointikyky muihin kasviproteiineihin verrattuna selittyikin osaltaan sen vahvalla pro-oksianttien sitomisella, paksujen rajapintojen muodostamisella ja proteiinin rakenteella. Faraji *et al.* (2004) esittivät natriumkaseinaatin sitovan rakenteeseensa 5,3 kertaa heraproteiinia enemmän rauta-ioneja. Lisäksi natriumkaseinaatti-proteiinin kyky muodostaa paksuja rajapintoja öljypisaroiden ympärille saattaa vaikuttaa sen parempiin ominaisuuksiin rajoittaa pro-oksianttien vuorovaikutusta lipidiperoksidien kanssa (Hu *et al.*, 2003). Natriumkaseinaatin rakenteessa oleva fosforyloitunut seriini, joka estää öljyn hapettumista sitoen (*scavenging*) vapaita radikaaleja ja kelaattimetalleja, saattaa myös vaikuttaa proteiinin edullisiin emulgointiominaisuuksiin (Kargar *et al.*, 2011a).

### 3.1.2 Heraproteiini

Heraproteiini on juustonvalmistuksen sivutuote, jonka hyödyntämiseen on havahduttu vasta viimeaikoina. Elintarviketeollisuudessa heraa käytetään usein heraproteiini-isolaatin muodossa. Heraproteiini sisältää arvokkaita ravintoaineita, jonka vuoksi sitä on ryhdytty käyttämään yhä enemmän elintarviketeollisuuden tuotteissa (El-Sayed ja Chase, 2011). Heraproteiini koostuu suurimmaksi osaksi kolmesta pinta-aktiivisesta proteiinista:  $\beta$ -laktoalbumiinista,  $\alpha$ -laktalbumiinista ja naudan seerumin albumiinista. Proteiinit ovat amfifiilisiä molekyylejä ja kykenevät täten parantamaan emulsion stabiilisuutta, laskemalla rajapinnan jännitystä. Heraproteiini kykenee muodostamaan öljypisaroiden päälle noin 1-2 nm:n paksuisia rajapintoja (Kellerby *et al.* 2006a). Heraproteiinin molekyylipaino on noin 18 000 Da (Bouyer *et al.*, 2012). Heraproteiinit ovat kaseiinia herkempiä lämpötilan nousulle, joka johtaa proteiinirakenteen denaturoitumiseen ja emulgointitehon laskuun (Sliwinski *et al.*, 2003).

### 3.1.3 Hydrofobiini

Hydrofobiinit (*hydrophobin*, HFB) ovat sieniperäisiä, noin sadasta aminohaposta koostuvia pinta-aktiivisia proteiineja (Wang *et al.*, 2002). Hydrofobiinia saadaan eristettyä esimerkiksi herkkusienistä (*Agaricus bisporus*). Proteiinin molekyylipaino on noin 7200 Da. Hydrofobiinit voidaan jakaa kahteen luokkaan HFBI ja HFBII. Luokkaan I kuuluvat hydrofobiinit ovat lähes liukenemattomia vesiliuoksiin, kun taas luokkaan II kuuluvat hydrofobiinit liukenevat vesiliuoksiin paljon helpommin (Linder, 2009). Hydrofobiinien suuri pinta-aktiivisuus johtuu niiden rakenteesta. Hydrofobiini on pinta-alaltaan suurimmaksi osaksi hydrofiilinen, omaten kuitenkin myös pienen hydrofobisen osan. Pinta-aktiivisuus voidaan havaita hydrofobiinien hakeutumisena hydrofobisen ja hydrofiilisen seoksen rajapinnalle. Rajapinnalle syntyy kalvo hydrofobiinin itsejärjestäytymisen seurauksena johtaen emulsioiden tapauksessa parempaan stabiilisuuteen (Reger *et al.*, 2011). Hydrofobiinin on havaittu toimivan öljy vedessä –emulsioissa stabiloimalla ja laskemalla emulsion rajapinnan jännitystä (Lumsdon *et al.*, 2005; Reger *et al.*, 2011). Hydrofobiinin adsorboitumisen rajapinnalle on kuitenkin havaittu olevan hitaampaa kuin pienten

pinta-aktiivisten aineiden (Lumsdon *et al.*, 2005). Hydrofobiinin laajempi käyttö elintarviketeollisuudessa vaatii proteiinin laajempaa tuottoa ja hinnan laskua. (Hektor ja Scholtmeijer, 2005).

### 3.2 Polysakkaridit emulgaattoreina

Polysakkarideja käytetään laajalti elintarvike-emulsioissa, johtuen niiden kyvystä paksuntaa, geeliyttää tai stabiloida emulsioita. Monien polysakkaridien on lisäksi havaittu omaavan antioksidatiivista luonnetta sitomalla vapaita radikaaleja. Osa polysakkarideista sisältää siirtymämetallisia epäpuhtauksia, jotka johtavat hapettumisasteen kasvuun. Polysakkaridien jatkuvan faasin paksuntamiskyvyn lisäksi osa polysakkarideista (muun muassa arabikumi ja modifioitu tärkkelys) kykenee toimimaan myös emulgaattorina (Waharo *et al.*, 2010a). Emulgointi polysakkarideilla tuottaa usein anionisia emulsiopisaroita kuten proteiineillakin stabiloitaessa (Waharo *et al.*, 2010a; Boon *et al.*, 2008).

#### 3.2.1 Arabikumi

Arabikumi on tunnetuin polysakkaridipohjainen emulgaattori elintarviketeollisuudessa. Arabikumia saadaan *Acacia senegal* puun maitiaisnesteestä. Arabikumin moolimassa vaihtelee  $3,0 \cdot 10^5 - 5,8 \cdot 10^5$  g/mol välillä, riippuen puun iästä ja alkuperästä. Arabikumi on heteropolysakkaridi, joka sisältää sekä proteiini- että polysakkaridiyksiköitä (Bouyer *et al.*, 2012). Arabikumin polysakkaridiyksiköt ovat hydrofiilisiä ja proteiiniryhmät hydrofobisia, minkä vuoksi arabikumi hakeutuu emulsion rajapinnalle. Arabikumi koostuu kolmesta osasta: arabinogalaktaanista (80-90 m-% kokonaispainosta), glykoproteiinista (2-4 m-% kokonaispainosta) ja arabinogalaktaaniproteiinista (10-20 m-% kokonaispainosta). Arabikumin proteiiniryhmän puuttuessa arabikumin emulgaattoriominaisuudet häviävät. Arabikumin pienen proteiiniosuuden vuoksi arabikumia tarvitaan suurempi määrä emulgointiin, verrattaessa pelkällä proteiinilla valmistettuun emulsioon (Phillips ja Williams, 2009). Pienen pisarakoon emulsioiden valmistamiseen vaaditaan melko suuria arabikumi-öljy-pitoisuuksia, yleensä noin 1:1 (Bouyer *et al.*, 2012).



### 3.2.2 Pekiini

Pekiini on elintarviketeollisuudessa yleinen paksuntamiseen ja stabilointiin käytettävä lisäaine. Lisäksi pektiinillä on emulgointi-ominaisuuksia. Pekiini on rakenteeltaan monimutkainen polysakkaridi, ja sitä saadaan uutettua kasvien soluseinistä, etenkin sitrushedelmien kuorista, omenan puristusjätteestä ja sokerijuurikkaasta. Pekiinin rakenne koostuu lähinnä esteröidyistä D-galakturonihappoyksiköistä  $\alpha$ -(1-4) ketjussa, joiden määrä polysakkaridissa riippuu pektiinin lähteestä ja erotusprosessista. Tämä pääketju haarautuu edelleen säännöllisesti ramnogalakturonisegmentein (*rhamnogalacturonan*) (Leroux *et al.*, 2003).

Erilaisia pektiinin lähteitä vertailtaessa sokerijuurikkaasta eritetyn pektiinin on havaittu omaavan parhaat emulgointiominaisuudet. Se eroaa muista lähteistä eristetyistä pektiineistä erityisesti proteiini- ja asetyyli-pitoisuudeltaan. Sokerijuurikkaasta eritetyn pektiinin paremmat emulgointiominaisuudet johtuvatkin todennäköisesti juuri pektiinissä olevista proteiineista. Pekiini kykenee muodostamaan stabiileja ja pisarakooltaan pieniä emulsioita. Sokerijuurikkaasta eritetyn pektiinin parempia emulgointiominaisuuksia on pyritty selittämään myös rakenteeltaan joustavan pektiinimolekyylin kyvyllä muodostaa toisen pektiinimolekyylien kanssa sidoksia, jotka mahdollistavat öljypisaran päälle muodostuvan suuremman emulgaattoripitoisuuden. Verrattaessa pektiinin emulgaattoriominaisuuksia esimerkiksi rakenteeltaan kerämäiseen arabikumiin tarvittiin arabikumia pitoisuudeltaan enemmän yhtäläisten emulgoitumisominaisuuksien saavuttamiseksi (Bouyer *et al.*, 2012; Leroux *et al.*, 2003). Pekiinin emulgointiominaisuuksien uskotaan johtuvan myös osaltaan pektiinin korkeasta asetyylipitoisuudesta, joka saattaa lisätä pektiinin hydrofobisuutta. Kuitenkin myös pektiinin matalilla asetyylipitoisuuksilla on onnistuttu valmistamaan hyvin stabiileja emulsioita (Leroux *et al.*, 2003). Pekiinin runsas asetyyliryhmien pitoisuus johtaa usein heikkoon geeliytymiseen, mutta toisaalta ylläpitää emulsion stabiilisuutta vähentämällä kalsiumin silloittumisesta aiheutuvaa flokkuloitumista (Drusch, 2007).



### 3.2.3 Tärkkelyksen oktenyylisukkinaatti-johdannainen

Tärkkelysten muokkaamisella kemiallisesti, fysikaalisesti tai entsymaattisesti saadaan aikaiseksi muunnettuja tärkkelyksiä, joita käytetään elintarviketeollisuudessa emulgaattoreina ja paksunnosaineina. Käsiteltäessä tärkkelystä alkaloidulla dikarboksyylihapon anhydridillä, saadaan aikaan tärkkelysjohdannainen, jolla on erinomaiset emulgointiominaisuudet. Muunneltu tärkkelys soveltuu erityisesti mausteiden, aromien ja vitamiinien emulgointiin. OSJ-tärkkelys on saanut elintarvikehyväksynnän EU ja USA:ssa. OSJ:n sallittu päivittäinen saantimäärä on rajoitettu 1000 mg/kg monitydyttymättömissä rasvahappovalmisteissa (Drusch ja Schwarz, 2006). Hi-Cap 100 on eräs kaupallinen tärkkelyksen oktenyylisukkinaatti-johdannainen, jolla on havaittu erinomaiset emulgointiominaisuudet (Soottitantawat *et al.*, 2005).

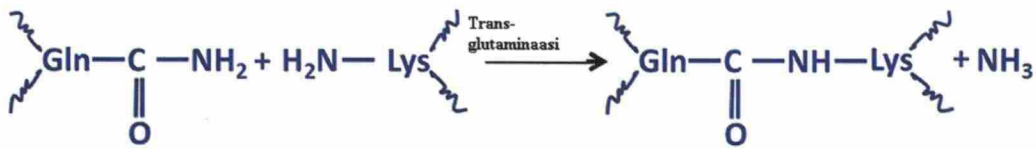
## 4 Emulsiorajapinnan muokkaus

Proteiinien denaturoitumisen on todettu lisäävän proteiinien kykyä toimia emulgaattoreina, hydrofobisten osien paljastuessa laskosrakenteesta. Proteiinien osittainen denaturoiminen saattaa parantaa proteiinien emulgoimisominaisuuksia, denaturoimisen aiheuttaessa proteiinien rakenteiden muuttumista. Liiallinen denaturoiminen saattaa kuitenkin johtaa proteiinin liukoisuuden laskuun, jolloin proteiini ei enää kykene adsorboitumaan ja kiinnittymään rajapintaan yhtä tehokkaasti. Emulsion proteiinien stabilointiominaisuuksia voidaan parantaa myös kemikaalien avulla, joskin niiden käyttö elintarvikesovelluksissa on melko vähäistä, johtuen ekonomisista ja ravitsemusturvallisista syistä (Damodaran, 2005). Seuraavaksi keskitytään emulsion rajapintojen muokkaukseen entsymaattisin keinoin sekä kerrostusmenetelmällä rajapinnan ominaisuuksien parantamiseksi ja edelleen emulsion hapettumisen hidastamiseksi.

#### 4.1 Rajapinnan proteiinien ristosilloittaminen

Proteiinit kykenevät laskemaan rajapinnan pintajännitystä synteettisiä pinta-aktiivisia emulgaattoreita vähemmän. Proteiiniemulgaattorien muodostamien emulsioiden rakennetta voidaan kuitenkin pyrkiä muokkaamaan stabiilimmaksi muun muassa proteiinien ristosilloittamisella (*cross-linking*, CL) (Ma *et al.*, 2012; Littoz *et al.*, 2008; Bönisch *et al.*, 2007). Ristosilloittamisen avulla emulsion rajapinta voi tiivistyä, jolloin emulsion öljypisaroiden uskotaan olevan vähemmän alttiina pisan ulkopuolelta tapahtuvalle aineensierrolle kuten esimerkiksi pro-oksidanttien diffuusiolle (Ma *et al.*, 2012; Partanen *et al.*, 2013). Ristosilloitettu rajapinta saattaa vähentää hapettumista aiheuttavien radikaalien reagoimista rajoittamalla siirtymämetallien vuorovaikutusta öljy- ja vesifaasin välillä sekä muodostamalla positiivisesti varautuneemman rajapinnan. Ristosilloitettu rajapinta saattaa myös estää pinta-aktiivisten hapettumistuotteiden siirtymistä öljypisarasta vesifaasiin ja täten hidastaa hapettumisen etenemistä (Ma *et al.*, 2012).

Emulsioiden funktionaalisten ominaisuuksien muodostumista, kuten emulsion stabiilisuuden kasvua on tutkittu emulsioissa, joissa proteiini on ristosilloitettu transglutaminaasilla (kaseiiniemulsio) ja lakkaasilla (heraemulsio) (Ma *et al.*, 2011; Littoz *et al.*, 2008; Færgemand *et al.*, 1998). Proteiinien entsymaattinen ristosilloittaminen mahdollistaa proteiinien rakenteen muokkauksen molekulaarisella tasolla. Transglutaminaasi on transferaasi, joka muodostaa isopeptidisidoksia proteiinin sisällä ja proteiinien välillä, sitoen proteiinien glutamiini- ja lysiini-aminohappoja yhteen. Kuvassa 2 on esitetty natriumkaseinaatin ristosilloittaminen transglutaminaasilla. Transglutaminaasin soveltuvuus ristosilloittamisessa riippuu käytettävän proteiinin rakenteesta. Meijeriteollisuuden proteiineista kaseiini on suotuisa proteiini transglutaminaasilla ristosilloittamiseen johtuen lähinnä sen avoimesta ja helposti saatavilla olevasta ketjurakenteesta. Heraproteiinit ovat vähemmän alttiita ristosilloittamiselle, sillä disulfidisidokset stabiloivat proteiinin pallomaista rakennetta, jolloin osa funktionaalisista ryhmistä on vähemmän alttiina reagoimaan (Bönisch *et al.*, 2007).



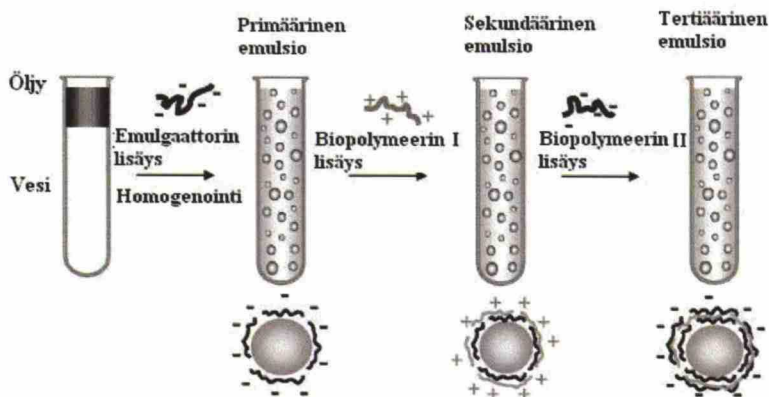
Kuva 2. Natriumkaseinaatin glutamiini- (Gln) ja lyysiini-aminohappojen (Lys) ristisilloittaminen transglutaminaasilla emulsion stabiilisuuden kasvattamiseksi (Ma *et al.*, 2012, muokattu).

Lakkaasit ovat kupari-ionin / -ioneja sisältäviä hapettavia entsyymejä, jotka käyttävät happea elektronin vastaanottamiseen ja tuottavat sivutuotteena vettä. Lakkaasit katalysoivat useiden aromaattisten substraattien hapettumista sekä indusoivat oligomeerien ja polymeerien muodostumista heraproteiini-emulsiossa (Ma *et al.*, 2011; Zeeb *et al.*, 2012). Lakkaasin katalyyysiä proteiinisysteemeissä on pyritty parantamaan lisäämällä pieniä fenolisia yhdisteitä. Näiden yhdisteiden elektroninvälityskyvyn oletetaan edistävän proteiinien ristisilloittumista. Proteiinien ristisilloittaminen näiden fenolisten yhdisteiden kanssa aiheuttaa kuitenkin värin muodostumista, joka ei ole yleensä toivottua esimerkiksi elintarvikesovelluksissa (Ma *et al.*, 2011).

#### 4.2 Rajapintojen monikerrostaminen

Monikerrosemulsioissa emulsion rajapinnat ovat muokattu elektrostaattisella kerrostustekniikalla (*layer-by-layer*, LBL). Kerrokset koostuvat useimmiten emulgaattorista ja biopolymeerimolekyyleistä, kuten kuvassa 3 on esitetty (Guzey ja McClements, 2006). Monikerroksisuudella voidaan muokata rajapinnan kemiallista koostumusta, varausta, paksuutta, läpäisevyyttä, emulsion reologiaa ja sitä kautta öljyfaasin vuorovaikutusta ympäristön kanssa. Monikerrokselliset emulsiot valmistetaan aluksi samalla tavalla kuin tavalliset emulsiot, homogenoimalla emulsio. Tämän jälkeen emulsion joukkoon lisätään muodostunutta rajapintaa nähdessä vastakkaisvarauksellista polyelektrolyyttiä, joka adsorboituu emulsion rajapintaan, jolloin muodostuu rajapinnaltaan kaksikerroksinen öljypisara (sekundäärinen emulsio). Kerrostamista voidaan jatkaa edelleen, lisäämällä emulsioon aina vastakkaisvarauksellista polyelektrolyyttiä, kuin mitä emulsioon on viimeksi lisätty (Waharo, 2010a).





Kuva 3. Emulsion rajapinnan monikerrostaminen. Homogenoidun emulsion joukkoon lisätään emulgaattoriin nähden vastakkaisvarauksellista biopolymeeriä, jolloin biopolymeeri saadaan tarttumaan öljypisaran rajapintaan. Sykliä voidaan toistaa lisäkerrosten aikaansaamiseksi, vaihtamalla biopolymeerin varausta jokaisen kerrostuksen jälkeen (Guzey ja McClements, 2006, muokattu).

Monikerrosemulusioilla on useita potentiaalisia sovelluskohteita elintarviketeollisuudessa. Rajapinnaltaan paksut ja korkeasti varautuneet emulsiot kykenevät nimittäin estämään emulsion öljypisarojen yhdistymistä ja emulsion lipidien hapettumista (Guzey ja McClements, 2006). Klinkesorn *et al.* (2005) tutkimuksessa on havaittu monikerroksellisten emulsioiden olevan perinteisiä emulsioita stabiilimpia hapettumiselle. Tutkimuksessa verrattiin lesitiini-emulsion ja sekundäärisen emulsion, jonka ulompi polymeerirajapinta oli kitosaania, ominaisuuksia keskenään. Emulsioiden hapettumista seurattiin hydroperoksidien ja TBARS:n (*thiobarbituric acid reactive substance*, TBARS) tuotolla (Klinkesorn *et al.*, 2005). Monikerroksisen emulsion parempi stabiilisuus hapettumista vastaan on todennäköisesti seurausta rajapinnan paksummasta rakenteesta, jolloin rautakatalyyttien kontakti lipidien kanssa heikentyy. Sekundäärisen rajapinnan omaavan emulsion positiivisen varauksen on epäilty myös heikentävän elektrostaattisesti positiivisten rautakatalyyttien diffuusiota öljyfaasiin. Toisaalta negatiivisen varauksen omaavan tertiäärisen emulsion todettiin vastustavan hapettumista yhtäläisesti sekundäärisen emulsion kanssa. Tämä tulos osoittaisi rajapinnan paksuuden tai tiiviyyden lisääntymisen olevan merkittävämpi tekijä hapettumisen hillitsemisessä kuin rajapinnan varaus (Guzey ja McClements, 2006).

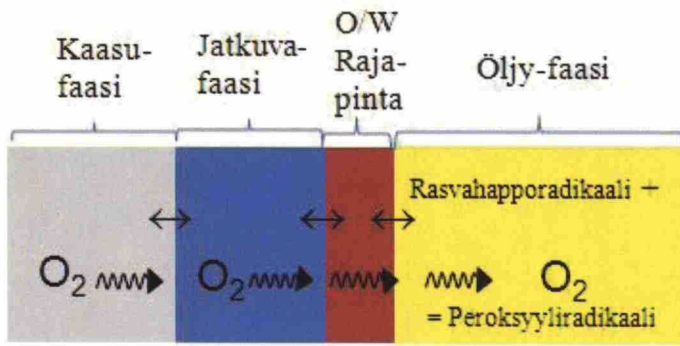


## 5 Aineensiirto ja aineensiirron mittaaminen emulsioissa

Emulsiossa on kolme erillistä faasia, joihin happi ja muut liuenneet aineet diffundoituvat suuremmasta pitoisuudesta pienempään. Aineiden liukoisuustasapainot faasirajapinnoilla vaikuttavat merkittävästi diffuusion (Kellerby *et al.* 2006b). Seuraavaksi käsitellään emulsion aineensiirtoon vaikuttavia tekijöitä ja aineensiirron mittaamenetelmiä.

### 5.1 Diffuusio emulsiossa

Diffuusiolla tarkoitetaan pienten molekyylien tai liuenneiden pisaroiden siirtymistä Brownin liikkeen ansiosta väkevämmästä pitoisuudesta laimeampaan kemiallisten potentiaalierojen tasoittamiseksi. Aineen diffuusiokertoimella tarkoitetaan nopeutta, jolla molekyyli liikkuu liuoksessa ( $\text{m}^2/\text{s}$ ). Molekyyli pyrkii diffundoitumaan siihen suuntaan, missä kemiallinen potentiaali on pienempi, kunnes termodynaaminen tasapaino on saavutettu (Pénicaud *et al.*, 2012). Kuvassa 4 on esitetty hapen diffuusio kaasufaasin kautta emulsion jatkuvaan faasiin eli vesifaasiin, josta happi diffundoituu rajapinnan läpi dispergoituneeseen faasiin eli öljyfaasiin. Jokaisen faasin rajapinnalle muodostuu happitasapaino, joka on kuvattu kuvassa 4 kaksisuuntaisella nuolella ja jokaisessa faasimatriisissa tapahtuva diffuusio on kuvattu kiemurtelevalla nuolella. Emulsiossa tapahtuvaan hapen aineensiirtoon ja sen nopeuteen vaikuttaa emulsion faasimatriisien lisäksi hapen liukoisuus sekä mahdollisesti rajapinnan muodostava emulgaattori.



Kuva 4. Hapen siirtyminen kaasufaasista jatkuvaan faasiin (vesifaasi) ja edelleen rajapinnan läpi dispergoituneeseen faasiin (öljyfaasi). Happi diffundoituu jokaisessa faasissa kohti pienempää pitoisuutta, muodostaen jokaisen faasin rajapinnalle happitasapainon. Hapen kulkeutuminen öljyfaasiin aiheuttaa rasvahapporadikaalien reagoimisen hapen kanssa ja edelleen peroksyyliradikaalien syntymisen (Kellerby *et al.*, 2006b).

Hapen diffuusio on välttämätön emulsion hapettumista ajatellen, mutta myös pro-oksianttien diffuusio emulsiossa voi olla ratkaisevassa asemassa hapettumisen käynnistymiseen. Mikäli hapen ja pro-oksianttien aineensiirtoa rajapinnan läpi öljyfaasiin saadaan hidastettua, kyetään hapettumisen käynnistymistä mahdollisesti hallitsemaan (Tikekar *et al.*, 2011; Bing *et al.*, 2008).

Aineen diffuusiota voidaan kuvata matemaattisesti Fickin ensimmäisen ja toisen lain avulla. Fickin ensimmäinen laki soveltuu stationääritilassa oleville systeemeille, joissa diffundoituvan molekyylin (esim. happi) konsentraatio oletetaan koko ajan vakioksi, jokaisella ajanhetkellä. Fickin ensimmäinen laki on esitetty yhtälössä yksi. Useissa tapauksissa konsentraatio kuitenkin muuttuu ajan funktiona, kun väkevämmästä pitoisuudesta diffundoituvat aineet levittäytyvät yhä enemmän laimeampaan pitoisuuteen. Tällaista tapausta kuvaa Fickin toinen laki, joka on esitetty yhtälössä kaksi. Fickin ensimmäinen laki vastaa siis Fickin toista lakia stationääritilassa (Crittenden *et al.*, 2012; Schomburg, 2011).

$$J = -D \frac{\partial c(x)}{\partial x} \quad (1)$$

$$\frac{\partial c(x,t)}{\partial t} = -\frac{\partial J}{\partial x} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (2)$$

jossa $J$	"diffuusiovirta" (esimerkiksi mol/m <sup>2</sup> ·s)
$D$	diffuusiokerroin (m <sup>2</sup> /s)
$c$	diffundoituvan komponentin konsentraatio (mol/l)
$t$	diffuusion ajanhetki (s)

Perustuen molekyylien Brownin liikkeeseen, Einstein on osoittanut, että molekyylien diffuusiokerroin nesteessä voidaan esittää kaavalla (yhtälö 3), jossa oletetaan pisaroiden liikkuvan toisistaan riippumattomasti. Esimerkiksi kun hapen diffuusiokerroin on vedessä noin  $2,12 \cdot 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/s (Pénicaud *et al.*, 2012), happimolekyylin yhden millimetrin matkan siirtymiseen vedessä menee noin 4 minuuttia (Miller, 1924; Crittenden *et al.*, 2012).

$$D = \frac{x^2}{2t} \quad (3)$$

jossa $x$	diffuusiomatka (m)
$t$	diffuusioon kulunut aika (s)

Pisaran (esim. happimolekyylin) diffuusiokertoimen arvo voidaan ideaalitapauksissa arvioida myös yhtälön 4 perusteella. Yhtälö 4 selittää muun muassa sen, että lämpötilalla ja liuoksen viskositeetillä on vaikutusta pisaran diffuusionopeuteen. Korkean viskositeetin omaavassa liuoksessa pisaran liikkuminen on yhtälön mukaan hitaampaa kuin matalan viskositeetin omaavassa liuoksessa. Lisäksi lämpötilan nousu nopeuttaa pisaran diffuusiota liuoksessa, sillä liuoksen kineettinen energia kasvaa ja siten pisaroiden satunnainen liike lisääntyy. Lisäksi diffundoituvan molekyylin pisarakoolla on merkitystä diffuusiokertoimen arvoon. Suurempi pisarakoko aiheuttaa diffuusiokertoimen pienenemisen (Schomburg, 2011).

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_T} \quad (4)$$

jossa $k_B$	Boltzmanin vakio ( $1,381 \cdot 10^{-23}$ J/K)
$R_T$	satunnaisesti liikkuvien pisaran säde liuoksessa (m)
$\eta$	liuoksen viskositeetti ( $\text{N} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ )
$T$	lämpötila (K)

Yhtälö 4 kuvaa emulsion viskositeettiriippuvuuden aineiden diffuusioon, korkean viskositeetin omaavan liuoksen hidastaessa diffuusiota. Viskositeetin ja pitoisuuden kasvu proteiiniliuoksissa saattaa hidastaa myös vapaiden radikaalien ja siirtymämetallien diffuusiota. Suuremmassa proteiinipitoisuudessa proteiinit saattavat sitoa entistä suurempia määriä siirtymämetalleja ja vapaita radikaaleja, estäen niiden diffuusiota dispergoituneeseen faasiin (Ries *et al.*, 2010; Waharo *et al.*, 2010a). Siirtymämetallien pääsy dispergoituneeseen faasiin saattaakin olla yksi merkittävä tekijä emulsion hapettumisen etenemisen kannalta (McClements ja Decker, 2000; Hu *et al.*, 2003).

### 5.1.1 Diffuusio jatkuvassa ja dispergoidussa faasissa

Hapen diffuusio faasista toiseen johtuu hapen kemiallisesta potentiaalierosta kahden faasin välillä. Tasapaino saavutetaan, kun hapen kemialliset potentiaalit ovat molemmissa faaseissa yhtä suuret (Pénicaud *et al.*, 2012).

Faasimatriisi vaikuttaa diffuusiokertoimen arvoon. Esimerkiksi oliiviöljyssä hapen diffuusiokerroin on pienempi, noin  $0,75\text{--}0,87 \cdot 10^{-5}$   $\text{cm}^2/\text{s}$ , kun taas vedessä, joka on tiheydeltään öljyä suurempaa, hapen diffuusiokerroin on noin  $1,6\text{--}3,54 \cdot 10^{-5}$   $\text{cm}^2/\text{s}$ , lämpötilan ollessa 25 °C (Pénicaud *et al.*, 2012). Diffuusiokertoimista voi siis päätellä, että happi diffundoituu vedessä nopeammin kuin öljyssä. Mitä nopeampaa diffuusio öljyfaasissa on, sitä nopeammin dispergoidun faasin kaikki rasvahapot ovat alttiina hapettumiselle. Hapen liukoisuus ilmasta ruokaöljyihin on noin 30 mg/l (Pénicaud *et al.*, 2012) ja hapen liukoisuus ilmasta veteen on noin 10 mg/l, lämpötilan ollessa 20 °C (McClements ja Decker, 2000).



### 5.1.2 Diffuusio rajapinnan läpi

Hapen diffundoitumisnopeudesta emulsion rajapinnan läpi on vain hyvin vähän tutkimustietoa (Tikekar *et al.*, 2011), jonka vuoksi sen merkitystä emulsion hapettumisen käynnistymiseen ei tunneta. Rajapinnan paksuus, koostumus ja tiheys saattavat osaltaan vaikuttaa hapen diffuusioon rajapinnan läpi. Esimerkiksi noin 10 nm:n paksuisia rajapintoja muodostavan kaseiinin on havaittu vastustavan emulsion hapettumista paremmin kuin 1-2 nm paksuisia rajapintoja muodostavan heran. Lisäksi rajapintojen ristosilloittamisella voidaan saada aikaiseksi tiiviimpiä rajapintoja (Kellerby *et al.* 2006a; Partanen *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2012), jolla saattaa olla merkitystä aineensiirtoon emulsiassa. Pienikokoisen hapen atomisäde on kuitenkin vain noin 60 pm (Slater, 1964), jonka vuoksi hapen diffuusio ei välttämättä juuri hidastu rajapinnan muokkaamisesta huolimatta (Tikekar ja Nitin, 2012).

Vaikka emulsion rajapinnan ominaisuuksilla ei olisi merkitystä hapen diffuusioon rajapinnan läpi, rajapinnalla on kuitenkin hyvin todennäköisesti merkitystä emulsion hapettumiseen. Emulgaattorikerros saattaa nimittäin toimia vapaiden radikaalien ja siirtymämetallien sitojana, jolloin niiden diffuusio öljyfaasiin vähenee ja edelleen emulsion öljyjen hapettuminen hidastuu (Ma *et al.*, 2012; Moska *et al.*, 2013; Waharo *et al.*, 2010a; Hu *et al.*, 2003; Kargar *et al.*, 2011a; Coupland ja McClements, 1996). Ristosilloitettu rajapinta saattaa lisäksi estää hapettumistuotteiden adsorboitumista rajapintaan ja edelleen rajapinnan läpi vesifaasiin ja täten rajoittaa hapettumisen etenemistä (Ma *et al.*, 2012).

## 5.2 Rajapinnan läpi tapahtuvan aineensiirron mittaaminen

Erilaisten emulgaattorien käytöllä voidaan saavuttaa rajapintaominaisuuksiltaan erilaisia emulsioita. Rajapintaominaisuudet vaikuttavat mahdollisesti hapen ja muiden yhdisteiden siirtymiseen rajapinnan läpi ja edelleen emulsion hapettumisnopeuteen. Tuntemalla rajapintojen merkitys aineensiirtoon voidaan kehittää yhä hapettumisresistentimpiä emulsioita. Öljyjen ja rasvojen hapettumisen mittaamiseen on kehitetty useita analyyttisiä tekniikoita, joista useat soveltuvat myös emulsion lipidien hapettumisen seurantaan (Coupland ja McClements, 1996).

Analysoimalla emulsion hapettumisnopeutta voidaan vertailla erilaisten emulgaattorien kykyä hidastaa emulsion hapettumista. Näiden tekniikoiden heikkoutena on muun muassa se, että öljyfaasi tulee usein erottaa jatkuvasta faasista ennen analyysien suorittamista (Tikekar *et al.*, 2011). Lisäksi erottamattomissa emulsioissa rajapintaan sitoutumattoman emulgaattorin merkitys vaikuttaa usein saatuun tulokseen.

Epäsuorissa mittausmenetelmissä määritykset perustuvat sellaisten molekyylien pitoisuuksien muutoksiin, jotka osoittavat lipidien hapettumisesta (Coupland ja McClements, 1996). Esimerkiksi kaasufaasissa tapahtuvaa hapen kulutusta tai sekundääristen reaktiotuotteiden syntyä voidaan mitata kaasukromatografisesti. Kaasufaasissa tapahtuva hapen kulutus osoittaa epäsuorasti emulsioon siirtyneen hapen määrää. Sekundääristen reaktiotuotteiden kuten propaalin synty kertoo n-3 monitydyttymättömien rasvahappojen (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA) hapettumisesta, kun taas pentanaalin ja heksanaalin muodostuminen kertoo n-6 PUFA:n hapettumisesta (Berton *et al.*, 2011; Berton *et al.*, 2012). Epäsuorien menetelmien heikkouksien vuoksi olisi tärkeää kehittää mittausmenetelmä, jolla rajapinnan ominaisuuksia voitaisiin mitata suorasti. Mikäli hapen diffuusio rajapinnan läpi pystyttäisiin mittaamaan voitaisiin saada suora menetelmä määrittää rajapinnan läpäisevyysominaisuuksia (Tikekar *et al.*, 2011). Seuraavaksi käsitellään suoria mittausmenetelmiä emulsion rajapintaominaisuuksien määrittämiseksi. Muita emulsion hapettumisasteen määrittämismenetelmiä on kuvattu luvuissa 6.2.1 ja 6.2.2.

### **5.2.1 Hapen diffuusion mittaaminen emulsiorajapinnan läpi**

Happea pidetään siirtymämetallien lisäksi yhtenä päätekijänä hapetusreaktioiden käynnistymiseen ja etenemiseen (Kargar, 2011b). Hapen pitoisuuden määrittäminen öljypisaran sisältä antaa tietoa rajapinnan läpäisevyysominaisuuksista. Tätä tietoa voidaan hyödyntää kehitettäessä yhä hapettumisstabiilimpia emulsioita. Emulsion reaaliaikaista *in-situ*-mittausta hapen diffuusion määrittämiseksi rajapinnan läpi ei ole kirjoittajan tiedon mukaan tutkittu kuin Tikekarin *et al.* (2011) toimesta. Mittausmenetelmässä hapen diffuusio emulsiorajapinnan läpi on määritetty

fluoresoivan happisensitiivisen reversiibelin väriaineen avulla. Fluoresoiva öljyliukoinen väriaine reagoi kvantitatiivisesti öljypisaran sisään diffundoituneen hapen kanssa. Happi ei kulu fluoresenssireaktiossa. Fluoresenssi on maksimissaan täysin hapettomassa tilassa (Tikekar *et al.*, 2011). Fluoresoivalla väriaineella on korkean fotostabiilisuus sekä pitkä eksitaatiotilan elinikä, mitkä parantavat sen stabiilisuutta mittausten aikana. Fluoresoivan väriaineen happisensitiivisyyttä on sovellettu myös muissa hapen pitoisuuden muutosta tarkkailevissa tutkimuksissa (Dani *et al.*, 2007; McNamara ja Rosenzweig, 1998).

Fluoresenssissa fluoresoiva atomi tai molekyyli absorboi siihen kohdistettua eksitaatiovaloa eli fotoneja tietyllä aallonpituudella ja fluoresenssin elinajan jälkeen emittoi eli säteilee matalaenergisiä fotoneja pidemmällä aallonpituudella. Fluoresoivat molekyylit absorboivat vain valon tiettyjä aallonpituuksia. Fluoresenssin emissio ilmenee myös vain tietyillä aallonpituuksilla emissioaallonpituuksien ollessa eksitaatio-aallonpituuksia suurempia. Aallonpituuden muutos johtuu siitä, että molekyyli menettää energiaansa absorption aikana ympäristöön eikä täten emittoi yhtä korkeaenergisiä aallonpituuksia. Tätä ilmiötä kutsutaan Stokesin siirtymäksi. Stokesin siirtymän ansiosta on mahdollista erottaa emittoituneet fotonit suuresta eksitaatiofotoneiden joukosta (Herman, 1998). Happi kykenee sammuttamaan monien fluoresoivien yhdisteiden fluoresenssin johtuen happimolekyylin ja fluoresoivan yhdisteen eli fluorokromin törmäyksestä. Happea sisältävässä emulsiossa viritystilassa oleva fluorokromi törmää happeen, jolloin fluorokromi ja happi muodostavat kompleksin, jonka purkautuessa fluorokromin eksitaatioenergia siirtyy hapelle. Tämä aiheuttaa sen, että emulsio ei emittoi yhtä paljon fluoresoivaa valoa, jolloin kokonaisfluoresenssitaso laskee. Fluoresenssin sammuminen hapen vaikutuksesta ei kuluta happea, vaan happi vapautuu reaktiossa takaisin kiertoon, eksitaatioenergian siirtyessä fluorokromilta hapelle (Lakowicz, 2006, László *et al.*, 2006). Yhtälössä 5 on kuvattu fluorokromin sammumisen periaate hapen vaikutuksesta. Yhtälössä  $F^*$  kuvaa virittynyttä fluorokromia,  $F$  virittymätöntä fluorokromia ja  $F^* : O_2$  fluorokromi-happi-kompleksia (László *et al.*, 2006).





Fluoresenssin muutosta ajan funktiona voidaan mitata muun muassa monileimalukijoilla (*multilabel plate reader*) tai fluoresenssispektroskoopilla. Monileimalukija koostuu valolähteestä, eksitaatio- ja emissiosuodattimista sekä fluoresenssidetektorista. Valolähde lähettää näytteeseen usean aallonpituuden valoa, joka suodatetaan halutun aallonpituuden valoksi eksitaatiosuodattimen avulla. Suodatettu valo heijastetaan näytteeseen, josta emittoitunut valo heijastetaan emissiosuodattimelle. Emissiosuodattimen läpi suodattunut valo jatkaa edelleen matkaansa detektorille, jossa fluoresenssin intensiteetti mitataan. Fluoresenssin emissiovalon mittaaminen voidaan suorittaa monileimalukijalla joko näytteen pohjasta tai pinnalta, riippuen koeasetelmasta (Anon., 2000; Manning ja Sontheimer, 1999). Fluoresenssispektroskoopin toimintaperiaate on hyvin samanlainen kuin monileimalukijalla. Fluoresenssispektroskoopilla on vain mahdollista mitata fluorokromin koko spektri, sillä laite sisältää monokromaattorin, jonka vuoksi mittaaminen on mahdollista kaikilla halutuilla aallonpituusalueilla, ilman erillisiä suodattimia (Lakowicz, 2006).

Fluoresenssin intensiteetin ja hapen konsentraation yhteys voidaan kuvata Stern-Volmerin yhtälöllä, joka on esitetty yhtälössä 6 (Cooper, 2011).

$$\frac{I_0}{I_t} = 1 + K[O_2] \quad (6)$$

jossa  $I_0$  fluoresenssin intensiteetti hapen puuttuessa  
 $I_t$  fluoresenssin intensiteetti, altistettu hapelle  $t$  sekuntia  
 $[O_2]$  hapen konsentraatio  
 $K$  Stern-Volmer-vakio



### 5.2.2 Vapaiden radikaalien määrittäminen öljyfaasista

Vapaiden radikaalien määrittäminen öljyfaasista tarjoaa myös mahdollisuuden tarkastella emulsion rajapintaominaisuuksia. Menetelmä perustuu fluoresoivaan väriaineeseen, jossa öljyfaasiin lisätyn fluorokromin fluoresenssi kasvaa, sen reagoidessa hapetuksessa syntyneiden radikaalien kanssa (esimerkiksi hydroksyylin, superoksidin ja peroksidin kanssa). Fluoresoiva diasetaattipohjainen väriaine reagoi radikaaleihin fluoresenssin kasvulla. Fluoresenssin muutosta voidaan mitata esimerkiksi fluoresenssispektroskoopilla. Menetelmää voidaan soveltaa erilaisten emulgaattorien rajapintaominaisuuksien vertailuun ja parhaan antioksidantin valintaan (Tikekar *et al.*, 2011b).

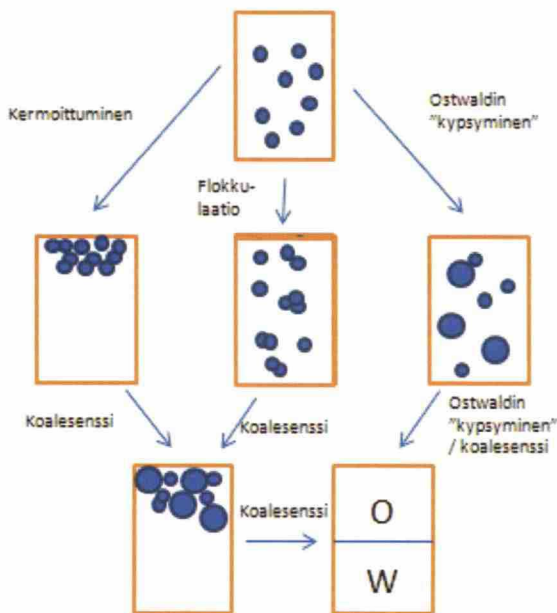
## 6 Emulsion stabiilisuus

Emulsion stabiilisuudella tarkoitetaan emulsion kykyä vastustaa emulsion ominaisuuksissa tapahtuvia muutoksia ajan kuluessa. Emulsion säilyminen stabiilina säilytyksen aikana riippuu muun muassa emulgaattorin luonteesta ja emulsion valmistusprosessista. Pienemmän pisarakoon emulsiot säilyvät stabiilimpina säilytyksen aikana kuin suuren pisarakoon emulsiot. Emulsion stabiilisuuden menetykseen voivat johtaa fysikaaliset, kemialliset ja mikrobiologiset tekijät (Bouyer *et al.*, 2012). Seuraavaksi käsitellään fysikaalisia ja kemiallisia syitä emulsion stabiilisuuden menetykseen.

### 6.1 Fysikaalinen stabiilisuus

Emulsion epästabiilisuutta kuvaavia fysikaalisia tekijöitä ovat kermoittuminen, flokkuloituminen, koalesenssi ja Ostwaldin ”kypsyminen” (*Ostwald ripening*). Kuvassa 5 on esitetty emulsioiden fysikaalisia hajoamismekanismeja. Kermoittumisella tarkoitetaan ilmiötä, jossa öljypisarat hakeutuvat emulsion pinnalle, johtuen niiden pienemmästä tiheydestä jatkuvaan faasiin nähden. Flokkulaatiossa kaksi tai useampi pisara emulsiossa yhdistyy, muodostaen rykelmän, pisaroiden ollessa kuitenkin erillisinä. Koalesenssissä kaksi tai useampi pisara

törmäävät toisiinsa, muodostaen yhden suuremman pisaran (Bouyer *et al.*, 2012). Ostwaldin ”kypsyminen” on ilmiö, jossa emulsio menettää stabiilisuuttaan pienten pisaroiden sisäfaasien liuessa ympäröivään faasiin ja yhdistyessä edelleen isompiin pisaroihin. Pienet pisarat liukenevat ympäröivään materiaaliin isompia pisaroita nopeammin ja liennut materiaali yhdistyy isompiin pisaroihin, aiheuttaen suurten pisaroiden kasvamisen ja pienten pisaroiden vähenemisen (Taylor, 1998). Ilmiö on sitä nopeampi, mitä liukoisempi dispergoitunut faasi on jatkuvaan faasiin. O/W-emulsioilla, jotka sisältävät hyvin heikosti veteen liukenevia öljyjä, esimerkiksi pitkäketjuisia triasyyliglyseroleja, Ostwaldin ”kypsyminen” on hyvin vähäistä. Liukoisuuden parantuessa ja pisarakoon kasvaessa myös ilmiön merkitys kasvaa (McClements, 1999).



Kuva 5. Emulsion stabiilisuuden menetykseen johtavia mekanismeja. Kermoittumisessa öljypisarat kasaantuvat emulsion pinnalle, flokkulaatiossa useampi öljypisara muodostaa rykelmän, koalesenssissä kaksi erillistä pisaraa muodostaa yhden suuremman pisaran ja Ostwaldin ”kypsymisessä” pienet pisarat yhdistyvät isompiin pisaroihin (Bouyer *et al.*, 2012).

## 6.2 Kemiallinen stabiilisuus

Emulsion stabiilisuus voi heikentyä myös kemiallisista syistä kuten hapettumisen seurauksena. Elintarvikeöljyjen hapettuminen johtaa ruuan laadun heikkenemiseen,

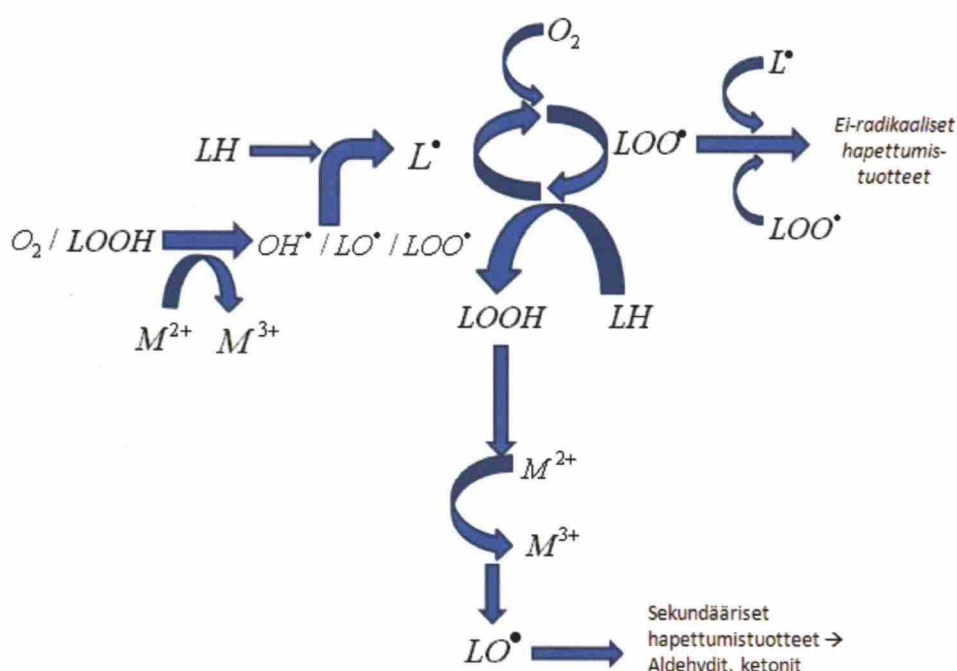
joka voidaan havaita negatiivisesti tuotteen aromissa, flavorissa, säilyvyysajassa ja ravitsemuksellisessa arvossa (Kellerby *et al.* 2006b). Öljyjen hapettuminen on öljy vedessä -emulsioissa nopeampaa kuin pelkässä öljyssä, sillä öljypisaroilla ja vesiliukoisilla yhdisteillä kuten pro-oksidanteilla on suurempi kontaktipinta-ala, joka altistaa hapettumisen käynnistymiseen (Waharo *et al.*, 2010a). Pro-oksidantit ovat hapettumista kiihdyttäviä tekijöitä ja sijaitsevat emulsion jatkuvassa faasissa (McClements ja Decker, 2000). Siirtymämetallit kuten rauta ja kupari ovat yleisiä pro-oksidantteja elintarvikkeiden raaka-aineissa, tuotantolaitteissa ja pakkausmateriaaleissa. Nämä tehokkaat pro-oksidantit kykenevät hajottamaan primäärisiä hapetustuotteita kuten lipidihydroperoksiedeja. Raudan kyky reagoida öljyn kanssa riippuu rauta-ionien fysikaalisesta sijainnista emulsiossa. Lipidihydroperoksidit omaavat polaarisemman luonteen kuin hapettumattomat rasvahapot, jonka vuoksi lipidihydroperoksidit keräytyvät mieluiten emulsion rajapinnalle, lähelle jatkuvassa faasissa olevia pro-oksidantteja. Hapettumisherkkyys riippuukin osaltaan siitä kuinka lähelle rajapintaa rauta-ionit kykenevät pääsemään (Waharo *et al.*, 2010a).

Emulsion hapettumisasteeseen vaikuttaa merkittävästi myös emulsion rasvahappokoostumus, vesifaasin pH ja ionikoostumus, anti- ja pro-oksidanttien tyyppi ja konsentraatio, happikonsentraatio, emulsion pisarakoko, rasvahappokonsentraatio sekä emulsion rajapinnan ominaisuudet kuten paksuus, varaus, reologia ja läpäisevyys (Waharo *et al.*, 2010a). Emulsioiden hapettumisherkkyys riippuu myös muun muassa öljypisaran kyvystä vetää puoleensa tai hylkiä kationisia metalleja. Emulsiopisaroiden varaus riippuu käytetyn emulgaattorin luonteesta, muiden emulsion rajapintaan adsorboituneiden komponenttien varauksista sekä emulsion pH:sta (Waharo *et al.*, 2010a). Tutkimuksissa on havaittu, että anionisilla pinta-aktiivisilla aineilla stabiloidut emulsiot ovat paljon herkempiä hapettumaan, johtuen niiden elektrostaattisesta luonteesta vetää siirtymämetalleja puoleensa. Kationiset pinta-aktiiviset aineet taas hylkivät näitä siirtymämetalleja, jolloin hapettuminen hidastuu (Boon *et al.*, 2008; Mancuso *et al.*, 2000)



Hapen diffuusion on havaittu olevan öljyn hapettumista rajoittava tekijä matalissa happikonsentraatioissa. Matalissa hapen konsentraatioissa öljyjen hapettuminen kasvaa, kun emulsiota sekoitetaan mekaanisesti tai jäähdytetään, sillä nämä prosessit kasvattavat hapen konsentraatiota emulsiassa. Suurissa happikonsentraatioissa hapen diffuusio on nopeampaa konsentraatiogradientin vuoksi, eikä happi täten ole rajoittava tekijä. Hapettumisen estämiseksi kaikkein tehokkain keino olisikin suojata elintarvike hapelta esimerkiksi pakkaamalla tuote vakuumiin tai tyypeen (Surh *et al.*, 2006).

Kuvassa 6 on esitetty emulsion hapettumisen eteneminen. Emulsion lipidien hapettuminen on radikaalireaktio tyydyttymättömien rasvahappojen (LH) ja hapen välillä. Lisäksi siirtymämetallit kiihdyttävät hapetusreaktion käynnistymistä. Siirtymämetallien kuten raudan katalysoidessa hapetusreaktion käynnistymistä, emulsion rajapinnassa oleva lipidihydroperoksidi (LOOH) reagoi ferro- tai ferri-ionin ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ) kanssa, muodostaen vapaan alkoksyyli- ( $\text{LO}^*$ ) tai peroksyyli-radikaalin ( $\text{LOO}^*$ ) (Kellerby *et al.*, 2006b; Coupland ja McClements, 1996; Waharo *et al.*, 2010a; Hu *et al.*, 2005). Lipidihydroperoksidia esiintyy luonnostaan monityydyttymättömiä rasvahappoja sisältävissä elintarvikeöljyissä noin 10–100  $\mu\text{mol/g}$ . Monet tutkimukset osoittavat, että siirtymämetallit kuten rauta-ionit ovat kaikkein tyypillisimpiä vesiliukoisia pro-oksiantteja aiheuttamaan hapettumista, niiden kyetessä reagoimaan rajapinnalla olevien hydroperoksidien kanssa. Rauta-ionit voivat esiintyä ferro-ionin ( $\text{Fe}^{2+}$ ) tai ferri-ionin ( $\text{Fe}^{3+}$ ) muodossa. Ferro-ioni ( $\text{Fe}^{2+}$ ) omaa ferri-onia ( $\text{Fe}^{3+}$ ) pro-oksidiivisemmän luonteen, johtuen sen korkeammasta liukoisuudesta ja reaktiivisuudesta. Koska metallit ovat hapettumisen kannalta tärkeitä pro-oksiantteja, niiden minimointi emulsiassa on oleellista hapettumisasteen pienentämiseksi (Hu *et al.*, 2005; Waharo *et al.*, 2010a). Hapettuminen voi käynnistyä myös hapen reagoidessa metalli-ionien kanssa muodostaen hydroksyyli-radikaalin ( $\text{OH}^*$ ) (Beldahl *et al.*, 2010).

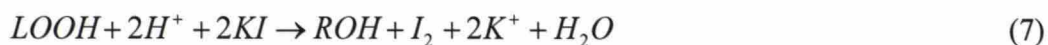


Kuva 6. Kaaviokuva emulsion rasvahappojen hapettumisesta hapen ja metalli-ionien vaikutuksesta. Hapettumisreaktio alkaa siirtymämetallien reagoimalla hapen tai lipidihydroperoksidien (LOOH) kanssa, muodostaen radikaalituotteen. Kuvassa LH merkitsee rasvahappoa,  $X^\bullet$  radikaalituotetta ja  $M^{x+}$  siirtymämetallia (Berdahl *et al.*, 2010, muokattu).

Syntyneet reaktiiviset radikaalit ( $LO^\bullet$ ,  $LOO^\bullet$  tai  $OH^\bullet$ ) reagoivat edelleen tyydyttymättömien rasvahappojen kanssa, irrottaen niiden vetyatomit, johtuen rasvahapporadikaalien ( $L^\bullet$ ) syntyyn. Rasvahapporadikaalit reagoivat edelleen hapen kanssa, muodostaen peroksyyliradikaaleja ( $LOO^\bullet$ ) ja edelleen lipidihydroperoksideja ( $LOOH$ ). Lipidihydroperoksidi muodostuvat peroksyyliradikaalien ja uusien rasvahappojen reagoimalla keskenään (Kellerby *et al.*, 2006b; Coupland ja McClements, 1996). Rasvahappojen hapettumisesta seuraa vapaiden radikaalien, lipidihydroperoksidien ja sekundääristen hapettumistuotteiden kuten aldehydien, ketonien, alkoholien ja hiilivetyjen muodostumista. Vain haihtuvat sekundääriset hapettumistuotteet ovat kuitenkin vastuussa ei-toivotun aromin ja flavorin muodostumisesta. Flavorin suhteen ketonit ja aldehydit aiheuttavat jo hyvin pieninä pitoisuuksina muutoksia tuotteen makuun. Hiilivedyillä kuten alkaaneilla ja alkeeneilla taas on korkein flavorikynnys (Coupland ja McClements, 1996).

### 6.2.1 Primääriset hapettumistuotteet

Emulsioiden kemiallista stabiilisuutta voidaan määrittää primääristen ja sekundääristen hapettumistuotteiden avulla. Primääristen hapettumistuotteiden määrittämisessä peroksidiluvun määrittäminen on yksi tyypillisimmistä analyyseistä. Lipidihydroperoksidit ovat yksi pääasiallinen syy, jonka vuoksi ruoan stabiilisuus heikkenee ja ruoassa alkaa esiintyä sivumakuja, jotka vaikuttavat haitallisesti ruoan laatuun, hyllykään ja kuluttajien hyväksyntään (Hornero-Méndez *et al.*, 2001). Lipidihydroperoksidi on emulsion primäärinen hapettumistuote. Peroksidiluku vastaa emulsiossa syntyneen lipidihydroperoksidin määrää hapettumisen aikana. Peroksidiluku voidaan määrittää esimerkiksi jodimetrisellä titrauksella. Menetelmässä määritetään jodin määrää, joka on syntynyt lipidiperoksidien ja kaliumjodidin reagoidessa keskenään, kuten yhtälöistä 7 ja 8 käy ilmi. Menetelmän heikkoutena on muun muassa jodin adsorboituminen tyydyttymättömiin rasvahappoihin, joka johtaa peroksidiluvun vääristymiseen. Lisäksi vesi aiheuttaa määrittämisessä suurta virhettä, jonka vuoksi näytteen öljy tulee erottaa emulsiosta huolellisesti ennen määrittämistä (Sun *et al.*, 2011).



Peroksidiluvun voi määrittää myös IDF standardin 74A:1991 mukaan, joka perustuu  $Fe^{2+}$ -ionin hapettamiseen värilliseksi  $Fe^{3+}$ -ioniksi peroksidien läsnä ollessa. Värireaktio saadaan aikaan  $Fe^{3+}$ -ionin ja tiosyanaatin muodostaessa punaisen kompleksin (Early, 1998; Ma *et al.*, 2012). Peroksidiluku kuvaa kuitenkin vain epäsuorasti emulsion rajapintaomaisuuksia, sillä myös emulsion jatkuva faasi vaikuttaa emulsion hapettumisasteeseen, eikä täten kuvaa suorasti vain rajapinnan läpäisevyysomaisuuksia (Tikekar *et al.*, 2011).

Toinen primäärisiä hapettumistuotteita määrittävä menetelmä on konjugoituneiden dieenien määrittäminen. Konjugoituneiden dieenien määrittämisellä voidaan selvittää emulsion hapettumisastetta, sillä konjugoituneiden dieenien määrän on havaittu



osoittavan vapaiden radikaalien tuottoa. Vapaat radikaalit ovat kuitenkin hyvin epästabiileja ja reagoivat hyvin nopeasti toisten komponenttien kanssa muodostaen stabiileja reaktiotuotteita. Tämän vuoksi konjugoituneiden dieenien määrä vastaa vain hapettumisvaiheen alussa emulsion hapettumisastetta. Hapettumisen ehdittyä jo pidemmälle, konjugoituneiden dieenien määrällä ja hapettumisasteella ei ole enää juuri minkäänlaista korrelaatiota. Konjugoituneiden dieenien määrää voidaan määrittää spektrofotometrisesti, aallonpituusalueella 230–240 nm. Näytteet tulee myös laimentaa ennen määrittystä ja niiden tulee olla puhdasta öljyä, sillä muiden mahdollisten komponenttien hapettuminen aiheuttaa määrittämiseen virhettä. Menetelmä ei myöskään sovellu käytettäväksi öljyille, joissa on korkea tyydyttyneiden rasvahappojen pitoisuus (Sun *et al.*, 2011).

### **6.2.2 Sekundääriset hapettumistuotteet**

Lipidien hapettumisessa syntyvät primääriset hapettumistuotteet ovat usein hyvin epästabiileja ja hajoavatkin useimmiten nopeasti erilaisiksi sekundäärisiksi reaktiotuotteiksi. Esimerkkinä sekundäärisistä hapettumistuotteista ovat eräät emulsiosta haihtuvat yhdisteet. Kaasukromatografian avulla emulsion hapettumisastetta voidaan seurata mittaamalla emulsion haihtuvia yhdisteitä kaasufaasista. Lipidien hapettuessa emulsiosta haihtuu muun muassa aldehydejä, ketoneja ja orgaanisia happoja. Kun emulsion hapetusaste kasvaa, myös haihtuvien komponenttien määrä kaasufaasissa kasvaa. Mittaus voidaan suorittaa injektoimalla emulsion kaasufaasista tietty tilavuus kaasua kaasukromatografiin. Kaasukromatografisessa mittauksessa voidaan mitata jotakin tiettyä haihtuvaa komponenttia tai haihtuvien komponenttien yhteismäärää (Sun *et al.*, 2011).

## KOKEELLINEN OSUUS

Työn kokeellisessa osassa pystytettiin mittausmenetelmä, jolla määritettiin hapen diffuusiota emulsion rajapinnan läpi. Mittausmenetelmästä pyrittiin luomaan toistettava sekä pyrittiin ymmärtämään mittausmenetelmän eri muuttujien vaikutus fluoresenssivasteisiin. Menetelmän pystytysvaiheessa etsittiin optimaaliset mittauslaitteen ajoparametrit, typetys ja hapetusolosuhteet sekä sopiva tilavuus mitattavalle emulsionäytteelle, jotta mittaukset olisivat mahdollisimman toistettavia.

Mittausmenetelmän pystytyksen jälkeen 14:ä erilaista rajapintaa verrattiin toisiinsa. Tavoitteena oli löytää mahdollisimman tehokkaasti hapen diffuusiota rajoittava rajapinta ja verrata hapen diffuusiokertoimia eri emulgaattorirajapinnoissa. Hapen diffuusiokertoimet rajapinnan läpi määritettiin kahdella erilaisella hapen diffuusion perustuvalla matemaattisella mallilla. Lisäksi käytettiin kolmatta mallia ennustamaan hapen diffuusiota vesifaasissa.

## 7 Materiaalit ja menetelmät

### 7.1 Materiaalit

Emulsioiden valmistuksessa käytettiin kahdeksaa erilaista emulgaattoria, jotka on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Käytettyjen emulgaattoreiden tuotetiedot.

Emulgaattori	Tuotenimi	Valmistaja
Natriumkaseinaatti	EM7	DMW
Hera	BiPro	Davisco
Pektiini	Sokerijuurikaspektiini	Danisco
Arabikumi	<i>Acacia</i> -puusta eristetty arabikumi	Sigma
Natriumlauryylisulfaatti	SDS	Sigma-Aldrich
Polysorbaatti 80	Tween80	Fluka
Muunneltu tärkkelys	HiCap 100	National Starch & Chemical
Hydrofobiini	HFB II	VTT (Linder et al., 2000)

Kaseiini-emulsion ristosilloittamiseen soveltuvana transglutaminaasina (*transglutaminase*, TG) käytettiin kaupallisesta transglutamiinivalmisteesta (Vesantti Oy, Helsinki, Suomi) fraktioitua, maltoosivapaata transglutaminaasia. Transglutaminaasin puhdistus suoritettiin kationinvaihtokromatografilla ja konsentrointi ultrasuodatuksella Lantto *et al.* (2005) tutkimuksen mukaisesti. TG-aktiivisuus määritettiin kuten Lantto *et al.* (2005) kuvasivat tutkimuksessaan.

Hydrofobiini II luokkaan kuuluva *T. Reesei*-homeella tuotettu hydrofobiini-proteiini erotettiin kasvatusalustasta tai *T. Reesei*-homeen rihmastosta käyttäen kaksifaasierotusta ja käänteisfaasikromatografiaa kuten on kuvattu Linder *et al.* (2000) tutkimuksessa.

Happisensitiivisenä fluoresoivana väriaineena käytettiin Santa Cruz Biotechnologyn tri(4,7-difenyyli-1,10-fenantroliini) rutenium(II) bi(heksafluorofosfaatti) -kompleksia (sc-213125). Väriaineen eksitaatiomaksimi sijaitsee aallonpituudella 455 nm ja



emissiomaksimi aallonpituudella 615 nm. Fluoresoiva väriaine ilmentää fluoresenssin intensiteettimaksiminsa hapettomassa tilassa.

## 7.2 Menetelmät

### 7.2.1 Emulgaattoriliuoksen valmistus

Taulukossa 2 on esitetty kaikkien emulsioiden emulgaattoripitoisuudet sekä emulsioiden säädetty pH-arvo. 1 % kaseiini-liuos (kas) valmistettiin liuottamalla natriumkaseinaatti (2,11 g/200 ml) MilliQ-veteen. Vedestä  $\frac{3}{4}$  lisättiin proteiinin joukkoon kiehuvana, liukoisuuden parantamiseksi. Jäähtyneen proteiiniliuoksen joukkoon lisättiin 0,04 % natriumatsidia ( $\text{NaN}_3$ ) estämään mikrobiologista kasvua. Proteiinin annettiin liueta magneettisekoituksella yön yli. Liuotuksen jälkeen liuoksen pH säädettiin vastaamaan pH-arvoa 7 (Neutralit pH 5-10, Merck) 1M NaOH:lla tai 1 M HCl:llä.

Ristisilloitettu natriumkaseinaatti-liuos (kas CL) valmistettiin kuten kas-liuos. Lisäyksenä kas-liuoksen valmistukseen, proteiinin liuotuksen jälkeen kaseiini-liuokseen lisättiin transglutaminaasia 100 nkat/g proteiinia. Transglutaminaasin ja natriumkaseinaattiliuoksen annettiin sekoittua magneettisekoituksessa neljä tuntia huoneenlämpötilassa.

Arabikumi-liuos sekä pektiini-liuos (pek) valmistettiin kuten kas-liuos. Hera-, SDS-, Tween80- sekä HiCap- liuos valmistettiin myös kuten kas-liuos, emulgaattorin liukenemisajan ollessa hera-liuoksella yksi tunti ja muilla emulgaattoreilla noin puoli tuntia. Emulgaattorit liuotettiin huoneenlämpöiseen MilliQ-veteen.

Hydrofobiini-liuos (HFB) valmistettiin liuottamalla hydrofobiini 50 millilitraan MilliQ-vettä ja sonikoimalla liuosta 3 mm:n tipillä (Sonics vibra cell VCX 500, Sonics & Materials Inc., USA) ja 40 %:n amplitudilla 1,5 minuuttia 10 sekunnin pulsseissa. Pulssien välillä pidettiin 5 sekunnin tauko.

Taulukko 2. Käytettyjen emulgaattoreiden pitoisuudet ja emulsioiden säädetty pH-arvo. Pitoisuudella 2 tarkoitetaan monikerrosemulsioissa sekundääriseen emulgaattorin pitoisuutta.

Pitoisuus (w/w)	Emulgaattori	Pitoisuus 2 (w/w)	Emulgaattori 2	pH
1,0 %	Kaseiini			7
1,0 %	Kaseiini CL			7
1,0 %	Hera			7
2,0 %	Arabikumi			7
1,0 %	Pektiini			7
0,5 %	Kaseiini	0,5 %	Pektiini	5
0,5 %	Kaseiini	0,5 %	Pektiini	7
1,0 %	Kaseiini	1,0 %	Pektiini	5
1,5 %	Kaseiini	0,5 %	Pektiini	5
1,0 %	SDS			7
1,0 %	Tween 80			7
1,0 %	HiCap			7
1,0 %	Hydrofobiini			5
1,0 %	Kas sonikoitu			7

### 7.2.2 Emulsion valmistus

Fluoresoivan väriaineen (Santa Cruz Biotechnology, USA) kantaliuos valmistettiin liuottamalla 5 mg väriainetta 5 ml:aan kloroformia (Rathburn Chemicals Ltd., Skotlanti). Kantaliuosta säilytettiin teflon/silikoni-tiivistekorkillisessa (Supelco 854996) lasipullossa haihtumisen estämiseksi. Kantaliuosta lisättiin öljyn sekaan niin, että väriaineen pitoisuus öljyssä oli 50 µg/g öljyä. Emulsioiden öljyfaasina toimi Raision rypsiöljy. Emulsioiden lopullinen öljypitoisuus oli 2,5 % (m/m).

Emulgaattori-liuosta ja öljy väriaine –liuosta esihomogenoitiin homogenisaattorilla (18000 rpm) 2 minuuttia (Heidolph silent crusher M, Heidolph Instruments, Saksa). Esihomogenoitu emulsio homogenoitiin edelleen korkeapainehomogenisaattorilla (M110-Y Microfluidizer®, Microfluidics, Yhdysvallat; pääkammio 75 µ, apukammio 200 µ), kierrättäen emulsio kymmenen kertaa laitteen läpi 500 bar paineessa. Homogenoitu emulsio jäähdytettiin jokaisen homogenointikierroksen jälkeen kierrättämällä emulsio jäähdytetyn vesihauteen läpi.

Kaseiinista ja pektiinistä valmistetut monikerrosemulsiot valmistettiin ensin homogenoimalla kaseiini-emulsio kuten edellä pH:ssa 7 ja tämän jälkeen

laimentamalla emulsio pektiini-liuoksella suhteessa 1:1, jolloin emulsiot saavuttivat taulukossa 1 esitetyt emulgaattoripitoisuudet. Monikerrosemulsoissa emulsion lopullinen öljypitoisuus oli 1,25 %. Emulsion pH säädettiin emulgaattoreiden yhdistämisen jälkeen taulukon 1 mukaisesti. Monikerrosemulsioiden annettiin sekoittua magneettisekoituksella 30 minuuttia tai seistä jääkaapissa 24 tuntia ennen typetyksen aloittamista, jotta inkuboitumisajan merkitys monikerrosemulSION muodostumiseen havaittiin.

Hydrofobiini-emulsio valmistettiin lisäämällä öljyn ja väriaineen seos 50 ml:aan hydrofobiini-liuosta. Emulsion öljypitoisuus oli 2,5 % ja fluoresenssiväriin määrä 50 µl/g öljyä. Emulsiota homogenoitiin yksivaiheisella homogenoinnilla. Emulsiota sonikoitiin 3 mm:n tipillä (Sonics vibra cell VCX 500, Sonics & Materials Inc., USA) ja 40 %:n amplitudilla 3,5 minuuttia, 10 sekunnin pulsseissa. Jokaisen pulssin välillä oli 5 sekunnin tauko.

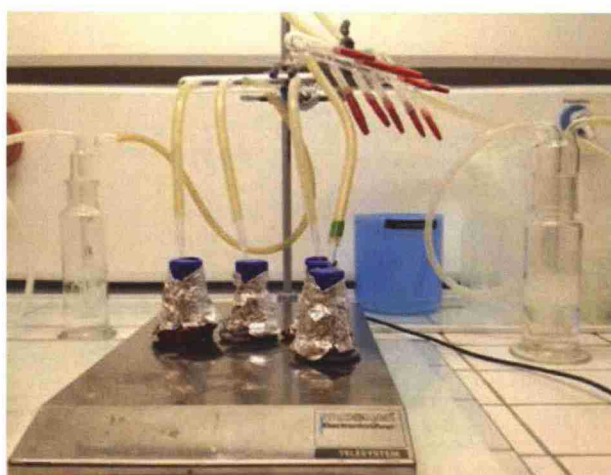
HFB-emulsion vertailuksi valmistettu sonikoitu kaseiini-emulsio valmistettiin lisäämällä öljyn ja väriaineen sekaan kaseiiniliuosta niin, että emulsiota saatiin 50 ml. Emulsion öljypitoisuus oli 2,5 % ja fluoresenssiväriin määrä 50 µl/g öljyä. Emulsiota esihomogenoitiin homogenisaattorilla kahden minuutin ajan, kierrosnopeudella 18000 rpm (Heidolph silent crusher M, Heidolph Instruments, Saksa). Emulsiota homogenoitiin edelleen sonikaattorilla 3 mm:n tipillä (Sonics vibra cell VCX 500, Sonics & Materials Inc., USA) ja 40 %:n amplitudilla 1,5 minuuttia, 10 sekunnin pulsseissa. Jokaisen pulssin välillä oli 5 sekunnin tauko.

### **7.2.3 Emulsion typetys**

Homogenoitu emulsio jaettiin neljään pulloon (10 millilitraa/pullo), joista kolmea emulsiota typetettiin ja yhtä emulsiota ilmastettiin paineilmalla. Fluoresoivan väriaineen fluoresenssimaksimin saavuttamiseksi emulsioita typetettiin yksi tunti ennen fluoresenssin mittaamista. Ilmastettu emulsio toimi nollanäytteenä, fluoresenssin pohjatason määrittämiseksi. Tasaisen typettymisen ja ilmaantumisen aikaansaamiseksi ja haihtumisen minimoimiseksi emulsioita sekoitettiin miedolla magneettisekoituksella typetyksen ja ilmastuksen ajan. Emulsioihin syötetyt



kaasuvirrat vakioitiin virtamittarilla (ADM1000, Agilent Technologies, USA), jotta emulsioiden haihtuminen olisi kaasutuskerrasta riippumatonta. Kaasutuspulot käärittiin folioon kaasutuksen ajaksi fluoresoivan väriaineen valoherkkyyden vuoksi. Kaasuvirrat syötettiin emulsioihin kuplituspullojen kautta vesihöyryllä kyllästettyinä, jotta emulsioiden haihtuminen saatiin minimoitua. Typetyksen ja hapetuksen suoritus on esitetty kuvassa 7. Typetyksen lopetuksen ja fluoresenssin mittauksen alkamisen välinen aika vakioitiin jokaisella emusiolle kahden minuutin pituiseksi.



Kuva 7. Typetys- ja ilmastusvirta kuplituspullojen kautta vesihöyryllä kyllästettynä magneettisekoituksessa oleviin emulsioihin.

#### 7.2.4 Fluoresenssin mittaus

Hapen diffuusiota emulsion rajapinnan läpi analysoitiin fluoresoivan väriaineen sammumisella. Fluoresenssia mitattiin monileimalukijalla (Victor2, Wallac, Suomi). Mittauslaite on esitetty kuvassa 8. Eksitaatiosuodattimena käytettiin 485 nm:n suodatinta ja eksitaatiosuodattimena 615 nm:n suodatinta. Näytteiden mittausaikana käytettiin yhtä sekuntia ja CW-lampun energia säädettiin 7000 yksikköön. Kaasutetut emulsiot pipetoitiin 96 kuoppaiseen mustaan kuoppalevyyn, jossa oli läpinäkyvä pohja (Corning 3603, Sigma-Aldrich, NY). Kuoppaan pipetoitiin 200 µl näytettä. Fluoresenssin vaimenemista seurattiin näytteen pohjasta 30 sekunnin välein, yhteensä 15 minuutin ajan. Diffuusiokertoimien määrittystutkimuksissa jokaista emulsiota valmistettiin kaksi eri erää ja typetyksessä emulsio jaettiin kolmeen eri

pulloon, eli jokaisen emulsion fluoresenssiarvot perustuvat kahden rinnakkaisen emulsion kuuteen mittaukseen.



Kuva 8. Emulsioiden fluoresenssin mittauslaite (Victor<sup>2</sup>, Wallac, Suomi). Kuvassa kuoppalevy on asetettu mittauslaitteeseen, josta laite siirtää levyn mittausalueelle koneen sisään.

#### 7.2.5 Pisarakoon määrittäminen

Emulsion öljypisaroiden koko määritettiin dynaamisella valonsironnalla (DLS) diffuusiokertoimen laskemiseksi ja emulsion stabiilisuuden varmistamiseksi (Zetasizer, Malvern instruments, UK) ennen ja jälkeen emulsion typetyksen. Emulsiot laimennettiin mittausta varten 1/1000 MilliQ-vedellä (pH 5). Laimennettu yhden millilitran näyte mitattiin kyvetissä (67.754, Sarstedt, Saksa). Taitekertoimen arvona käytettiin öljylle soveltuvaa arvoa 1,47 ja vedelle 1,332. Mittauskulmana käytettiin 173° takaisinsirontaa. Näytteen annettiin tasoittua ennen mittauksen aloittamista 120 sekuntia.

Monikerroseemulsioiden pisarakoot määritettiin staattisella valonsironnalla (LS 230, Beckman Coulter, USA), koska pektiini aiheutti suurien pektiinipisaroiden syntymistä ja ylimääräistä taustaa. Myös hydrofobiini-emulsion pisarakoko määritettiin Coulterilla, emulsion suuremman pisarakoon takia. Coulterilla pisarakoot määritettiin kullekin emusiolle kaksi kertaa, mittausajan ollessa 90 sekuntia.

Ajoliuoksena käytettiin pH 5:een säädettyä suodatettua MilliQ-vettä. Taitekertoimina käytettiin vedelle 1,332 ja öljylle 1,47.

## 7.2.6 Data-analyysit

### 7.2.6.1 Fluoresenssin normalisointi

Absoluuttiset fluoresenssiarvot normalisoitiin yhtälön 9 mukaisesti, jotta erilaisten emulsioiden fluoresenssin sammumista voitiin vertailla.

$$\text{Fluoresenssin normalisoitu intensiteetti [\%]} = \frac{(I_{t\text{Typpi}} - I_{t\text{Ilma}}) \cdot 100}{(I_{0\text{Typpi}} - I_{0\text{Ilma}})} \quad (9)$$

jossa  $I_{t\text{Typpi}}$  typetetyn näytteen fluoresenssi, altistettuna t sekuntia ilmalle.

$I_{t\text{Ilma}}$  ilmastetun näytteen fluoresenssi, altistettuna t sekuntia ilmalle.

$I_{0\text{Typpi}}$  typetetyn näytteen fluoresenssi ajanhetkellä nolla.

$I_{0\text{Ilma}}$  ilmastetun näytteen fluoresenssi ajanhetkellä nolla.

### 7.2.6.2 Hapen diffuusiokertoimen määrittäminen

#### Malli 1

Hapen diffuusiokertoimet emulsion rajapinnan läpi laskettiin kahdella erilaisella matemaattisella mallilla. Diffuusiokertoimen määrittäminen mallin yksi mukaisesti perustui Tikekarin *et al.* (2011) tutkimuksessa käyttämään matemaattiseen malliin. Mallin 1 teoria perustui Fickin toisen lain pallolle määritettyyn yhtälöön, jossa pisan pintakonsentraatio oletettiin vakioksi. Yhtälön ratkaisussa öljypisaroiden oletettiin olevan ei-steady-state tilassa, jolloin yhtälölle saatiin tarkka ratkaisu ajan ja paikan suhteen. Mallin 1 ratkaisussa diffuusiokerroin määritettiin öljypisaran pinnalta öljypisaran keskipisteeseen. Ratkaisu on esitetty yhtälössä 10 (Crank, 1975).



$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} e^{-\frac{Dn^2\pi^2 t}{a^2}} \quad (10)$$

jossa  $n$  100

$D$  hapen diffuusiokerroin ( $\text{m}^2/\text{s}$ )

$a$  emulsiopisaran säde (m)

Yhtälöstä 6 (s. 26) saatiin ratkaistua hapen konsentraatio ajanhetkillä  $t$  ja  $\infty$ . Ratkaisuksi saatiin yhtälöt 11 ja 12.

$$M_t = \frac{\left(\frac{I_0}{I_t} - 1\right)}{K} \quad (11)$$

$$M_\infty = \frac{\left(\frac{I_0}{I_\infty} - 1\right)}{K} \quad (12)$$

Kokeellisista mittaustuloksista voitiin siis ratkaista  $\frac{M_t}{M_\infty}$  -arvo yhtälön 13 mukaisesti.

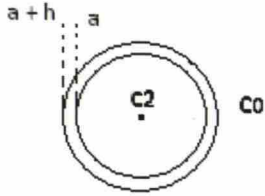
$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{(I_0 - I_t)I_\infty}{(I_0 - I_\infty)I_t} \quad (13)$$

Mallin 1 mukainen diffuusiokerroin voitiin määrittää yhtälöstä 10 pienimmän neliösumman menetelmällä kun  $a$  oli tiedossa, minimoimalla kokeellisten ja ennustettujen  $\frac{M_t}{M_\infty}$  -arvojen erotuksien neliöiden summaa. Yhtälön 10 ratkaisussa  $n$ :n arvoksi määrättiin 100.

## Malli 2

Tikekar *et al.* (2011) määrittivät hapen diffuusiokerrointa emulsiassa sovittamalla kokeellista dataa pallolle tarkoitettuun Fickin toisen lain yhtälöön (Crank, 1975).

Yhtälöllä laskettava diffuusiokerroin perustuu hapen diffuusion määrittämiseen öljypisaran kuoresta öljypisaran ytimeen. Työssä haluttiin kuitenkin määrittää vain emulgaattorikerroksen läpi tapahtuva hapen diffuusio, jonka vuoksi diffuusiokerroin määritettiin myös toisella matemaattisella mallilla. Kuvassa 9 on esitetty öljypisaran rakenne ja reunaehdot konsentraation ja paikan välille mallilla 2.



Reunaehdot:  $C(a) = C_2$  ja  $C(a+h) = C^0$

Kuva 9. Malliin 2 perustuvassa tasapainotila-ratkaisussa diffuusiomatkana käytettiin rajakerroksen paksuutta, kun hapen konsentraation oletettiin olevan öljypisaran ulkopuolella  $C_0$  ja kaikkialla öljypisaran sisäpuolella  $C_2$ . Kuvassa  $a$  kuvaa öljypisaran sädettä ja  $a+h$  öljypisaran ja rajapinnan yhteenlaskettua sädettä.

Tasapainotilassa pallon muotoiselle kappaleelle Fickin toinen laki voidaan esittää yhtälön 14 muodossa (Crank, 1975). Yhtälössä oletetaan, että konsentraation muutosnopeus on hetkittäin nolla, jotta yhtälön ratkaisu saadaan yksinkertaisemmaksi, mutta käytännön kannalta kuitenkin riittävän tarkaksi. Laskennassa aikariippuvuus otetaan huomioon ainetaseen kautta.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right) = 0 \quad (14)$$

Yhtälön 14 yleinen ratkaisu voidaan esittää yhtälöllä 15 (Crank, 1975).

$$C = B + \frac{A}{r} \quad (15)$$

Ratkaisemalla yhtälön 14 vakio  $B$  reunaehdoista ja merkitsemällä ratkaisut yhtä suuriksi, saadaan ratkaistua vakio  $A$ . Saadaan siis yhtälöt 16 ja 17.

$$A = -(C^0 - C_2) \frac{a(a+h)}{h} \quad (16)$$

$$B = C_2 + (C^0 - C_2) \frac{a(a+h)}{h} \quad (17)$$

Sijoittamalla A ja B yleisen ratkaisun yhtälöön (yhtälö 15), saadaan yhtälö joka on muotoa 18.

$$C = C_2 + (C^0 - C_2) \left( \frac{a}{h} + 1 \right) \left( 1 - \frac{a}{r} \right) \quad (18)$$

Hapen ainevirta emulsiossa rajapinnan läpi voidaan ilmaista Fickin ensimmäisen lain kaavalla, joka on esitetty yhtälössä 19.

$$J_{O_2} = D \frac{dc}{dr} \quad (19)$$

Derivoimalla yhtälö 18 r:n suhteen, merkitsemällä  $r = a$  ja sijoittamalla se yhtälöön 19, saadaan yhtälö 20.

$$J_{O_2}(a) = D(C^0 - C_2) \left( \frac{1}{h} + \frac{1}{a} \right) \quad (20)$$

Vuo voidaan merkitä myös ainevirtana pinta-alayksikköä kohti (yhtälö 21) ja pallolle laskettaessa yhtälö saadaan yhtälön 22 muotoon.

$$J_{O_2} = \frac{V}{A} \frac{dc}{dt} \quad (21)$$

$$\frac{dc}{dt} = \frac{3}{a} J_{O_2} \quad (22)$$

Sijoittamalla yhtälö 20 lausekkeeseen 22 ja saattamalla yhtälö muotoon 23, saadaan yhtälö 24.

$$\frac{dc_2}{dt} = A - BC_2 \quad (23)$$

$$\frac{dc_2}{dt} = \frac{3}{a} DC^0 \left( \frac{1}{a} + \frac{1}{h} \right) - \frac{3}{a} D \left( \frac{1}{a} + \frac{1}{h} \right) C_2 \quad (24)$$

Ratkaisemalla yhtälöstä 23  $C_2$  yleisessä muodossa ja sijoittamalla termi takaisin yhtälöön 24, saadaan  $C^0$  ja  $C_2$  ratkaistua.

Merkitsemällä  $\frac{C_2}{C^0} = \frac{M_t}{M_\infty}$ , saadaan ratkaisuksi yhtälö 25.

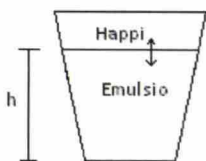
$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - e^{\left( -\frac{3}{a} D \left( \frac{1}{a} + \frac{1}{h} \right) t \right)} \quad (25)$$

Mallin 2 mukainen diffuusiokerroin voitiin määrittää yhtälöstä 25 pienimmän neliösumman menetelmällä, kun  $a$  ja  $h$  olivat tiedossa, minimoimalla kokeellisten ja ennustettujen  $\frac{M_t}{M_\infty}$  -arvojen erotuksien neliöiden summaa.

### Malli 3

Mikäli rajapinta ei rajoita hapen diffuusiota emulsiossa, fluoresenssimittauksissa mitataan hapen diffuusiota emulsion vesifaasissa. Hapen diffuusiokertoimen määrittäminen mallilla 3 perustuu lineaariseen malliin. Malli 3 mallintaa hapen diffuusiota liuoksessa, joka on yhdestä suunnasta alttiina hapen diffuusiolle (kuva 10).





Kuva 10. Malliin kolme perustuva hapen diffuusio emulsion vesifaasissa. Mallissa oletetaan, että happi pääsee diffundoitumaan emulsioon yhdestä suunnasta. Termi  $h$  on kuoppalevyssä olevan emulsion kerrospaksuus.

Liuokseen siirtyneen hapen määrä  $M_t$  voidaan laskea pinta-alayksikköä kohti kaavalla 26 (Crank, 1975).

$$M_t = 2C_0 \left( \frac{Dt}{\pi} \right)^{1/2} \cdot \pi r^2 \quad (26)$$

$M_\infty$  voidaan laskea kaavalla 27, jossa  $h$  on hapen kulkeman matkan maksimaalinen pituus (kuoppalevyssä olevan emulsion näytepaksuus) ja  $C_0$  hapen maksimaalinen konsentraatio ajanhetkellä  $\infty$ .

$$M_\infty = C_0 V = C_0 \pi r^2 h \quad (27)$$

Jakamalla yhtälöt 26 ja 27 keskenään, saadaan yhtälö 28.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{2\sqrt{Dt}}{h\sqrt{\pi}} \quad (28)$$

Koska yhtälössä 13 määriteltiin, että yhtälö 29 pitää paikkansa, saadaan yhtälö 30, josta voidaan ratkaista hapen diffuusio lineaarisessa tilanteessa.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{(I_0 - I_t)I_\infty}{(I_0 - I_\infty)I_t} \quad (29)$$

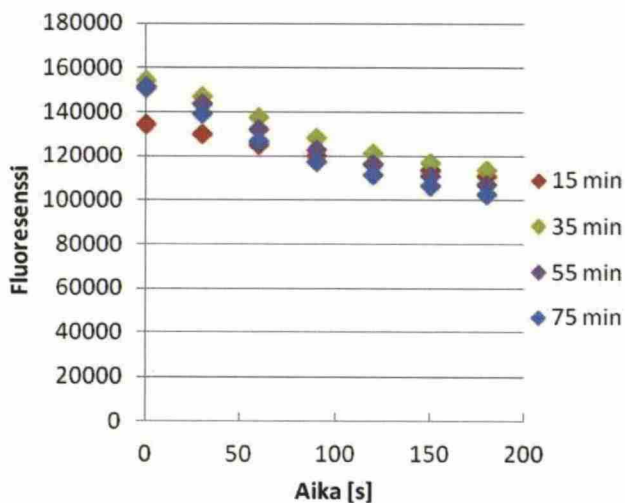
$$\frac{(I_0 - I_t)I_\infty}{(I_0 - I_\infty)I_t} = \frac{2\sqrt{Dt}}{h\sqrt{\pi}} \quad (30)$$

Mallin 3 mukainen hapen diffuusiokerroin voitiin määrittää yhtälöstä 30 pienimmän neliösumman menetelmällä, kun  $h$  tunnettiin, minimoimalla kokeellisten ja ennustettujen  $\frac{M_t}{M_\infty}$  -arvojen erotuksien neliöiden summaa.

## 8 Tulokset ja tulosten tarkastelu

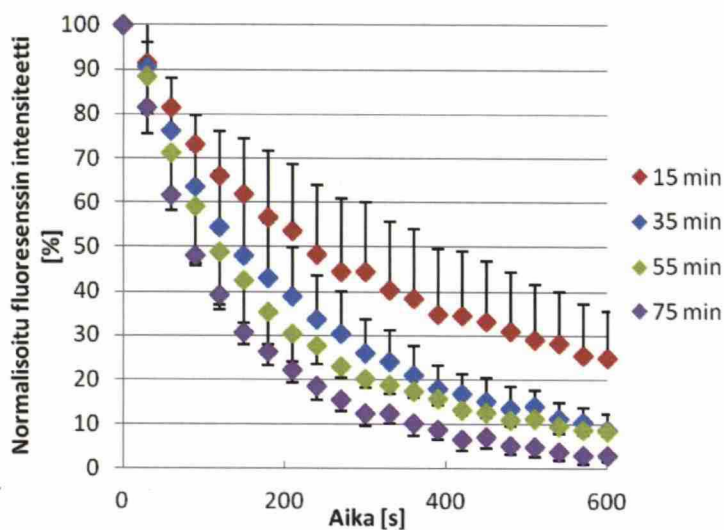
### 8.1 Typetysajan vaikutus fluoresenssitaseeseen

Emulsion typetysajan vaikutusta emulsion fluoresenssitaseeseen ja tulosten hajontaan tutkittiin ajanhetkillä 15, 35, 55 ja 75 minuuttia. Kuvassa 11 on esitetty typetysajan vaikutus kaseiini-emulsion fluoresenssitaseeseen ajan funktiona ja kuvassa 12 on esitetty typetysajan vaikutus kaseiini-emulsion normalisoituun fluoresenssitaseeseen. Jokaisen ajanhetken fluoresenssin intensiteetti on kolmen mittauksen keskiarvo.



Kuva 11. Typetysajan (15, 35, 55 ja 75 min) vaikutus 1 % kaseiini-emulsion fluoresenssitaseeseen. Jokaisen ajanhetken fluoresenssin intensiteetti on kolmen mittauksen keskiarvo.

Kuvasta 11 havaitaan, että 15 minuutin typetys antoi kaikkein matalimman fluoresenssivasteen. 35 minuutin ja 55 minuutin typetysaika antoi lähes yhtäläiset vasteet. 75 minuutin typetysaika antoi myös melko samankaltaisen vasteen mittauksen alussa, mutta fluoresenssitaso alkoi laskea muita nopeammin. 15 minuutin typetyksessä havaittiin kaikkein suurin hajonta mittaustoistojen välillä (liite 1). 55 minuutin typetyksellä emulsioilla oli matalin hajonta ja korkea intensiteetti suhteessa muihin typetysaikoihin.



Kuva 12. Typetysajan vaikutus 1 % kaseiini-emulsion normalisoituun fluoresenssitasoon. Jokaisen ajanhetken fluoresenssin intensiteetti on kolmen mittauksen keskiarvo. Kuvassa hajonnat on esitetty 15 ja 35 minuutin kohdalla vain keskiarvo + keskihajonta sekä 55 ja 75 minuutin kohdalla keskiarvo – keskihajonta, kuvan selkeyttämiseksi. Hajonnat ovat kuitenkin kaikissa tapauksissa  $\pm$  keskihajonta.

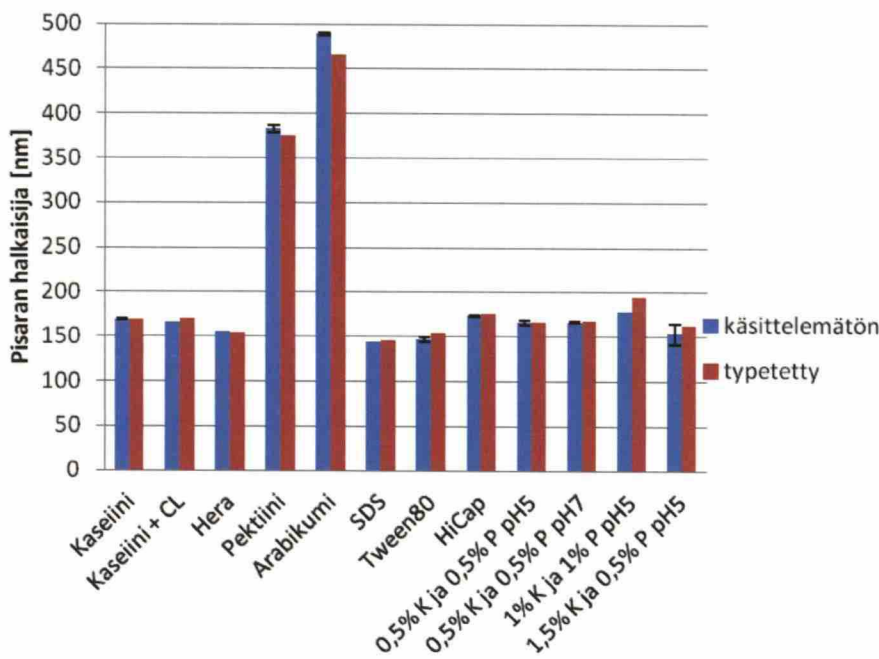
Kuvasta 12 havaitaan, että 15 minuutin typetys aiheutti suurimman hajonnan (keskihajonta 13 prosenttiyksikköä). Tämä johtui todennäköisesti riittämättömästä typetysajasta. Typetysajan ollessa riittämätön, emulsio sisältää happea, jolloin fluorokromi ei ole saavuttanut intensiteettimaksimiaan. Typetysajan ollessa 35 minuuttia kaseiini-emulsio osoitti vielä suurta hajontaa (keskihajonta 7,2 prosenttiyksikköä). Kaseiini-emulsiolla fluoresenssivaste ajan funktiona pieneni kun typetysaika kasvoi. Tulosten perusteella typetysajaksi valittiin yksi tunti, jotta

toistojen välinen hajonta olisi kohtuullinen. Kirjallisuudessa emulsion typettamisestä hapen poistamiseksi löytyy vain rajallisesti tietoa. Tikekar *et al.* (2011) havaitsivat 2,5 tunnin typettämisen olevan heidän typetyssysteemissään tarpeellinen. Typetyisaika haluttiin kuitenkin nyt tehdyssä tutkimuksessa minimoida, sillä näytteissä tapahtuvan haihtumisen havaittiin nostavan fluoresenssitasoa. Lisäksi mekaanisen sekoituksen ajateltiin voivan vaikuttaa emulsion fluoresenssitasoon ja pisarakokoon, mikä saattaisi vääristää tuloksia. Tunnin kaasutuksen aikana typetetyistä emulsiosta haihtui noin 0,5 % ja ilmastetusta emulsiosta noin 1 % (liite2).

## **8.2 Emulsion pisarakoko ja stabiilisuus typetyksen aikana**

Pisarakoko vaikuttaa emulsion diffuusiokertoimeen (yhtälö 10 ja 25) ja antaa samalla kuvan emulsion stabiilisuuden säilymisestä typetyksen aikana (Phillips ja Williams, 2009). Tämän vuoksi emulsioiden pisarakoko määritettiin ennen ja jälkeen emulsion typetyksen. Kuvassa 13 on esitetty korkeapainehomogenisaattorilla valmistettujen käsittelemättömien ja typetettyjen emulsioiden pisarakoot. Kuvassa 14 on esitetty sonikaattorilla valmistettujen käsittelemättömien ja typetettyjen emulsioiden pisarakoot.



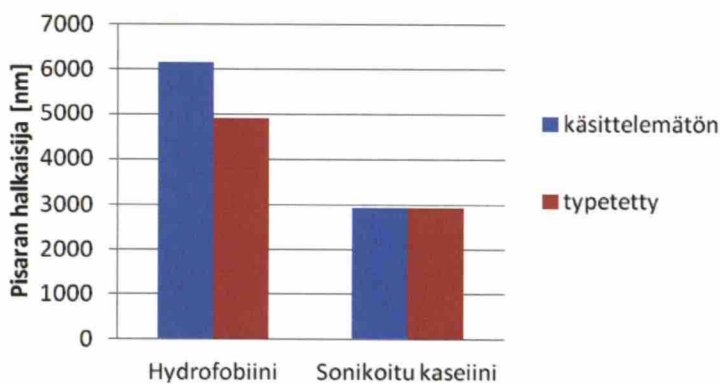


Kuva 13. Korkeapainehomogenisaattorilla valmistettujen tuoreiden (käsittelemätön) ja tyytetyjen emulsioiden pisarakoot (nm). Monikerrosemulasioissa kaseiini on merkitty kirjaimella K ja pektiini kirjaimella P. CL tarkoittaa transglutaminaasilla ristosilloitettua kaseiini-emulsiota. Kuvassa on esitetty käsittelimättömien emulsioiden keskihajonnat. Tyytetyjen emulsioiden hajontaa ei määritetty.

Kuvasta 13 havaitaan, että korkeapainehomogenisaattorilla valmistetuista emulsioista vain pektiini- ja arabikumi-emulsiot poikkesivat pisarakooltaan muista emulsioista. Pisarakooltaan pektiini- ja arabikumi-emulsiot havaittiin suurimmiksi (halkaisija pektiinillä noin 370 nm ja arabikumilla noin 470 nm), muiden emulgaattoreiden muodostaessa pisarakooltaan lähes yhdenmukaisia emulsioita (halkaisijaltaan noin 150 nm). Kuvasta 13 havaitaan myös, että emulsiot säilyivät stabiileina tyytetyksen aikana. Emulsioiden voidaan siis olettaa olevan hyvin stabiileja mekaaniselle sekoitukselle, pisarakoon pysyessä lähes vakiona emulgaattorista ja tyytetyksestä riippumatta. Esimerkiksi arabikumi-emulsion ja pektiini-emulsion tapauksessa tyytetyksen laski lievästi pisarakokoa.

Emulsioiden pisarakoon muodostumiseen vaikuttivat emulgaattorin ja sen pitoisuuden lisäksi homogenointilaitteisto sekä öljy/emulgaattori –suhde. Riittämätön

emulgaattorimäärä johtaa suurempien pisaroiden syntymiseen, sillä emulgaattoria ei ole riittävästi peittämään jokaista öljypisaraa. Tästä seuraa koalesenssia (Bouyer *et al.*, 2012). Arabikumilla ja pektiinillä havaittiin muihin emulsioihin verrattuna kaikkein suurin pisarakoko, josta voidaan päätellä, että arabikumi- ja pektiini-emulsiot olivat muita emulgaattoreita hitaampia muodostamaan rajapintoja. Floury *et al.* (2000) saivat korkeapainehomogenisaattorilla valmistetun 10 % auringonkukkaöljyä sisältävän hera-emulsion pisarakooksi noin 500 nm. Kuvasta 13 nähdään, että hera-emulsion pisarakoko oli tutkimuksessa noin 150 nm. Flouryn *et al.* (2000) tutkimuksessa käytettiin 47 MPa painetta ja maksimissaan kahta kierrätyskertaa, joka voi selittää sen, että Flouryn *et al.* (2000) pisarakoko oli hieman tutkimuksessa määrittämäämme suurempi.



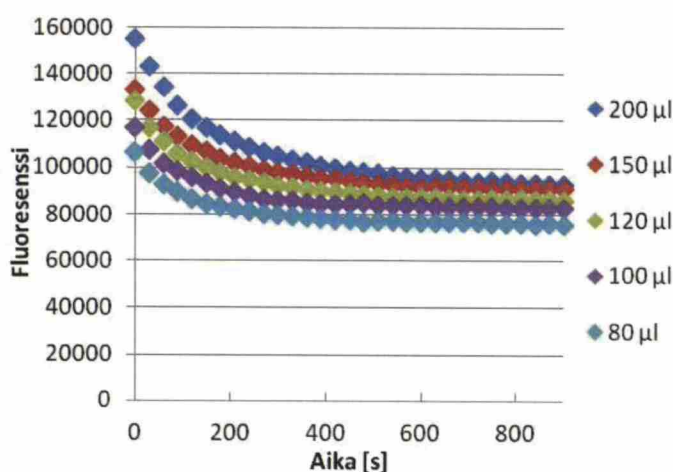
Kuva 14. Sonikoidun hydrofobiini- ja kaseiini-emulsion pisarakoot (nm) tuoreille emulsioille ja typetetyille emulsioille sekä käsitlemättömien emulsioiden pisarakokojen keskihajonnat.

Kuvasta 14 havaitaan, että sonikoitujen emulsioiden pisarakoko oli huomattavasti suurempi kuin korkeapainehomogenoitujen emulsioiden. Sonikaattori ei siis ole yhtä tehokas muodostamaan pienen pisarakoon emulsioita. Typetetyn hydrofobiini-emulsion pisaran halkaisija oli noin 1000 nm pienempi kuin juuri valmistetun. Tämä kertoo todennäköisesti siitä, että emulsio ei ollut kovinkaan stabiili, jonka vuoksi emulsiossa esiintyi erikokoisia öljypisaroita. Sonikaattorilla valmistetun kaseiini-emulsion pisarakoko oli noin 20 kertaa korkeapainehomogenisaattorilla valmistettua kaseiini-emulsiota suurempi. Siitä huolimatta kaseiini-emulsio vaikutti kuvan 14

perusteella muodostavan melko stabiilin emulsioon, pisarakoon säilyessä tyytetyksestä huolimatta vakiona.

### 8.3 Fluoresenssimittauksen näytemäärän vaikutus fluoresenssitasoon

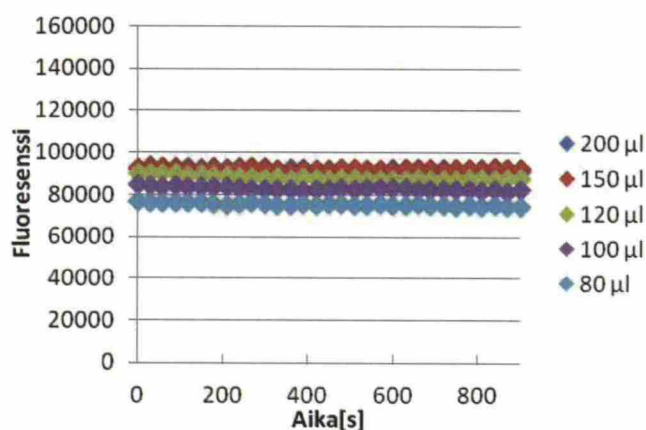
Emulsion näytemäärän ajateltiin voivan vaikuttaa fluoresenssimittauksessa emulsiossa tapahtuvaan hapen diffuusioon, sillä happi tasapainottuu hitaammin paksummassa emulsiokerroksessa, kun se pääsee diffundoitumaan emulsioon vain yhdestä suunnasta (Einsteinin yhtälön 3 mukaisesti). Tämä saattaa aiheuttaa suurilla näytetilavuuksilla korkeampaa fluoresenssin vastetta ajan funktiona kuin pienissä tilavuuksissa. Kuvassa 15 on esitetty tyytetyjen kaseiini-emulsioiden ja kuvassa 16 ilmastettujen emulsioiden fluoresenssitasot ajan funktiona näytetilavuuden vaihdellessa.



Kuva 15. Tyytetyyn kaseiini-emulsion fluoresenssin keskiarvot ( $n=3$ ) eri näytetilavuuksilla.

Emulsion fluoresenssin intensiteetti laski näytetilavuuden laskiessa, kuten kuvasta 15 havaitaan. Näytetilavuus aiheutti myös fluoresenssitason laskua ilmastetuissa näytteissä, kuten käy ilmi kuvasta 16. Näytemäärä 200 µl antoi hyvin samankaltaisen vasteen kuin 150 µl, jonka vuoksi niiden käyrät ovat kuvassa 16 lähes päällekkäin. Kuvasta 16 havaitaan myös, että ilmastettujen näytteiden fluoresenssitaso ei koskaan ollut nolla, vaan emulsiosta aiheutui fluoresenssimittauksessa aina taustaa.

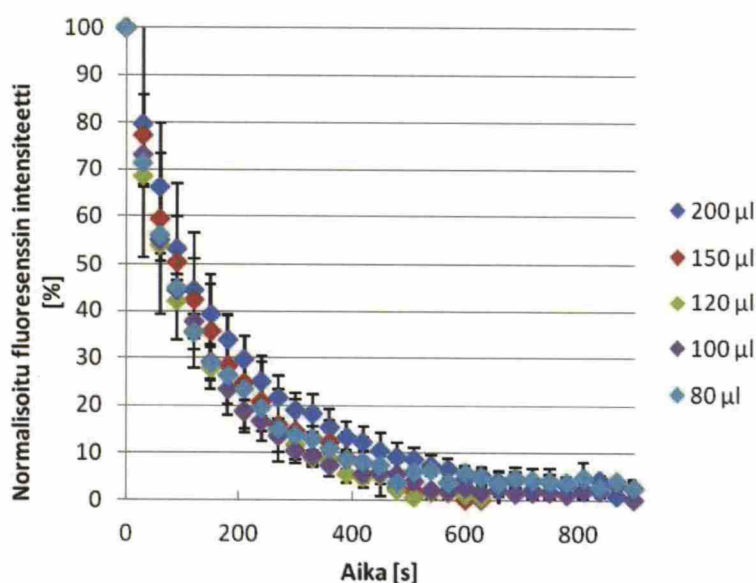
Näytetilavuus vaikutti siis emulsion fluoresenssivasteeseen, mutta myös ilmastetun näytteen fluoresenssitasoon. Fluoresenssivaste laski näytetilavuuden laskiessa todennäköisesti siksi, että fluoresenssin suhteellinen määrä pieneni pienemmässä näytetilavuudessa.



Kuva 16. Ilmastetun kaseiini-emulsion fluoresenssin keskiarvot ( $n=3$ ) ajan funktiona, eri näytetilavuuksilla.

Normalisoiduissa käyrissä (kuva 17) näytetilavuuksien välillä ei enää havaittu merkittäviä systemaattisia eroja. Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että ilmastetun näytteen fluoresenssitaso laski melko samassa suhteessa tyytettyjen emulsioiden fluoresenssitasoihin nähden, kun tilavuus pieneni. Tämä seurauksena normalisoidut käyrät antoivat näytetilavuudesta riippumatta hyvin samanlaiset vasteet, eli näytetilavuudella ei havaittu olevan vaikutusta tuloksiin.





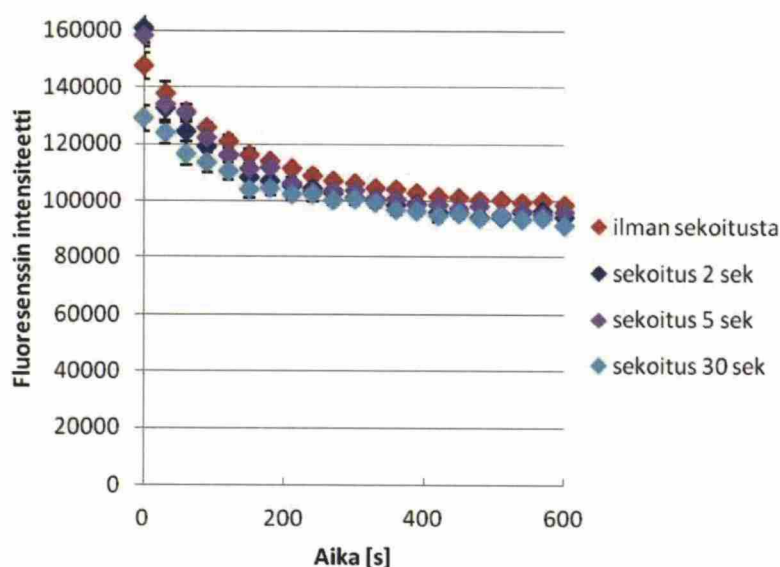
Kuva 17. Näytetilavuuden vaikutus normalisoituun fluoresenssitason. Kuvassa hajonnat on esitetty 150 µl:n ja 200 µl:n kohdalla vain keskiarvo + keskihajonta sekä 80 µl, 100 µl:n ja 120 µl:n kohdalla keskiarvo – keskihajonta, kuvan selkeyttämiseksi. Hajonnat ovat kuitenkin kaikissa tapauksissa keskiarvo ± keskihajonta.

Näytetilavuudella 80 µl emulsion keskihajonta oli 2,2 prosenttiyksikköä, näytetilavuudella 100 µl 2,3 prosenttiyksikköä ja näytetilavuudella 120 µl 3 prosenttiyksikköä. Näytetilavuudella 150 µl emulsion keskihajonta oli suurempaa suhteessa muihin näytetilavuuksiin (keskihajonta 6,7 prosenttiyksikköä). Näytetilavuudella 200 µl emulsion keskihajonta oli 3,4 prosenttiyksikköä. Emulsion erisuurille hajonnoille suhteessa näytetilavuuteen ei löytynyt systemaattista syytä, vaan hajonnat tuntuivat vaihtelevan yhtäläisistä koeolosuhteista huolimatta melko satunnaisesti. Lopulliseksi näytetilavuudeksi valittiin 200 µl, sen tuottaman hieman suuremman fluoresenssivasteen ja melko kapean keskihajonnan johdosta.

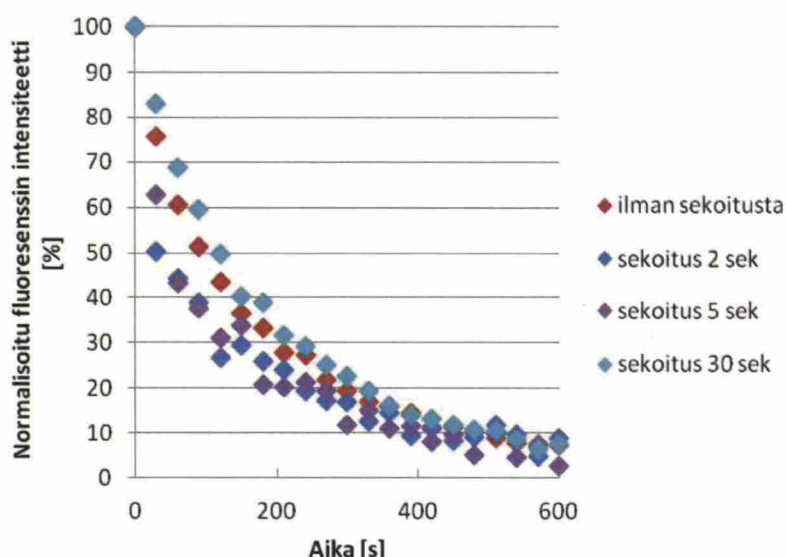
#### 8.4 Sekoituksen vaikutus fluoresenssimittaukseen

Emulsion sekoituksella ennen fluoresenssimittauksen aloitusta haluttiin selvittää hapen diffundoitumisnopeutta jatkuvaan faasiin ja edelleen dispergoituneeseen faasiin. Sekoituksen vaikutusta fluoresenssimittaukseen tutkittiin kun näytetilavuutena oli 200 µl ja typetysaikana yksi tunti. Emulsion sekoittaminen

toteutettiin levylukijalla, jolla kokeiltiin sekoitusaikoja 2, 5 ja 30 sekuntia. Kyllästettävän aineen sekoittaminen tulisi johtaa parempaan aineensiirtoon (Dotto ja Pinto, 2011). Sekoittamattomassa emulsiossa diffuusio etenee hitaammin, emulsion pinnalta kohti pohjaa. Sekoituksen vaikutus fluoresenssituloksiin saattaisi siis olla ratkaiseva, mikäli sekoitus aiheuttaisi fluoresenssin nopeampaa sammumista ajan funktiona. Kuvassa 18 on esitetty sekoituksen vaikutus fluoresenssin intensiteettiin ajan funktiona ja kuvassa 19 sekoituksen vaikutus normalisoituihin fluoresenssitasoihin ajan funktiona.



Kuva 18. Sekoituksen vaikutus kaseiini-emulsion fluoresenssin intensiteettitasoon ajan funktiona  $\pm$  keskihajonta. Sekoituskäsitellyt emulsiot sekoitettiin juuri ennen fluoresenssin mittauksen aloittamista.



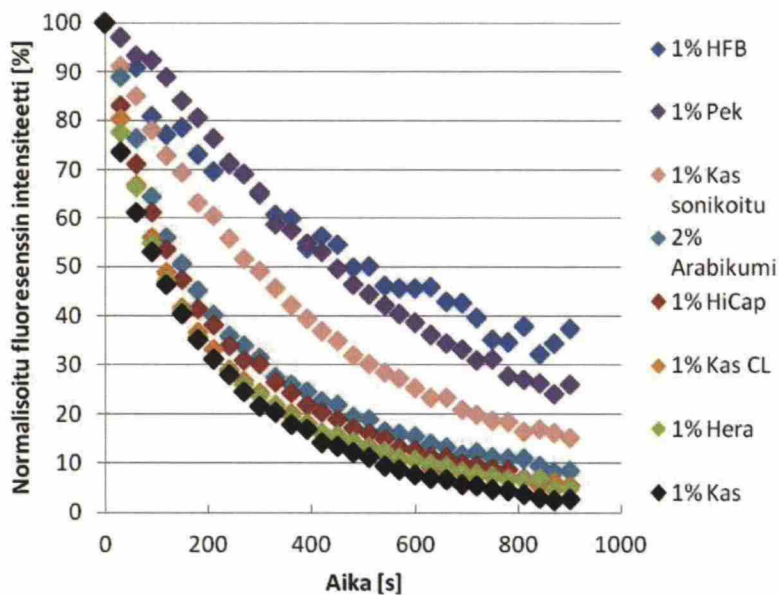
Kuva 19. Sekoituksen vaikutus kaseiini-emulsion normalisoituun fluoresenssitasoon. Emulsio sekoitettiin juuri ennen fluoresenssin mittauksen aloittamista.

Kuvasta 18 ja 19 havaitaan, että fluoresenssin taso ei juuri laske, vaikka emulsiota ravistelisi ennen mittauksen alkua. Kuvasta 18 havaitaan, että 30 sekunnin pituisella ravistelulla fluoresenssitaso on matalampi kuin muilla käsittelyillä, mutta fluoresenssin laskuun on vaikuttanut todennäköisesti myös se, että mittaus aloitettiin 30 sekuntia muita emulsioita myöhemmin. Tällöin happea on ehtinyt diffundoitumaan emulsioon enemmän. Kuvasta 18 huomataan myös, että kahden ja viiden sekunnin pituiset ravisteluajat eivät laske fluoresenssitasoa lainkaan, vaan pikemminkin nostavat sitä. Korkeamman fluoresenssitason havaitaan kuitenkin olevan merkityksetön kun emulsioille määritetään normalisoidut fluoresenssikäyrät, joissa ilmastettujen näytteiden fluoresenssitasot otetaan huomioon. Sekoituksen vaikutus fluoresenssitasoon ei siis kuvien 18 ja 19 perusteella näytä olevan kriittinen tekijä hapen siirtymiseen emulsioon. Tämä on kirjallisuuteen verrattaessa ristiriitainen tulos, joka osoittaa, että mittaustapahtumaa ja fluorokromin toimintaa emulsiossa ei kyetä täysin ymmärtämään.

Emulsioiden fluoresenssimittauksissa optimaalisimmiksi olosuhteiksi valittiin tunnin tyytety, 200  $\mu$ l:n näytetilavuus ja näytteiden ravistelemattomuus ennen fluoresenssimittauksia.

### 8.5 Rajapintojen vaikutus fluoresenssin sammumiseen

Työssä tarkasteltiin 14 erilaista emulsion kykyä hidastaa hapen kulkua ja siten fluoresenssin sammumista. Fluoresenssin sammuminen on osoitus hapen diffuusiosta emulsioon. Kuvassa 20 on esitetty proteiini- ja polysakkaridipohjaisten emulsioiden normalisoidut fluoresenssitaset ajan funktiona. Tulokset on laskettu yhtälöllä 9. Kuvan 20 käyrien keskihajonnat on esitetty taulukossa 3.



Kuva 20. Proteiini- ja polysakkaridipohjaisten emulsioiden normalisoidut fluoresenssivasteet ajan funktiona.

Kuvan 20 tuloksista havaitaan, että pektiini, hydrofobiini ja sonikoitu kaseiini ovat ainoat emulgaattorit, joilla saadaan muista emulgaattoreista poikkeava tulos. Näiden emulsioiden fluoresenssitaso pysyy muihin emulsioihin nähden kaikkein korkeimmalla ajan funktiona. Tulos saattaa viitata näiden emulgaattoreiden parempaan kykyyn rajoittaa hapen kulkua pektiinirajapinnan läpi öljyfaasiin.



Taulukossa 3 on esitetty kaikkien emulsioiden fluoresenssin sammumisen keskihajontojen keskiarvot sekä emulsioiden pisarakoot. Taulukosta 3 havaitaan, että mitä suurempi fluoresenssin intensiteetti emulgaattorilla säilyy ajan funktiona, sitä suurempi emulsion keskihajontojen keskiarvo pääsääntöisesti on. Toisaalta myös kuvassa 21 olevalla SDS-emulsiolla on melko suuri hajonta, vaikka emulsion fluoresenssitaso laskeekin nopeasti. Toisten emulsioiden mittaustoistojen välille aiheutunut hajonta ei ollut systemaattista. Suurempi hajonta saattoi johtua esimerkiksi tyytetyksen ja pipetoinnin aiheuttamasta vaihtelusta tai toisten emulsioiden epätasalaatuisuudesta, joka toi toistojen välille suurempaa vaihtelua.

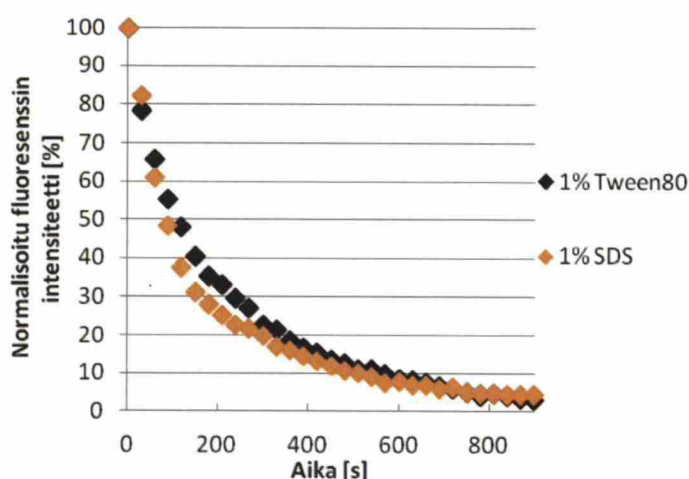
Taulukko 3. Emulsioiden normalisoitujen fluoresenssin intensiteettien keskihajontojen (n=6) keskiarvot sekä emulsioiden pisarakoot.

Emulgaattori	Keskihajonta	Pisarakoko [nm]
1 % HFB	11,5	6653
1 % Pekiini	6,2	386
1 % Kas sonikoitu	2,8	2920
1 % Arabikumi	2,0	489
1 % HiCap	2,5	172
1 % Kas CL	2,1	166
1 % Hera	1,8	157
1 % Kas	2,0	164
1 % Kas + 1 % Pek pH5	6,2	178
0,5 % Kas + 0,5 % Pek pH5 24h	4,3	168
0,5 % Kas + 0,5 % Pek pH5 0,5h	5,1	166
1,5 % Kas + 0,5 % Pek pH5 0,5h	5,6	153
0,5 % Kas + 0,5 % Pek pH7 0,5h	2,0	167
1 % SDS	5,0	144
1 % Tween80	1,9	147

Korkeapainehomogenoidun ja sonikoidun kaseiini-emulsion fluoresenssitasot poikkesivat toisistaan (noin 10 prosenttiyksikön ero). Kaseiini-emulsiot poikkesivat valmistusmenetelmän lisäksi toisistaan myös pisarakoon suhteen. Tämä antaisi viitteitä siitä, että suuremman pisarakoon omaavat emulsiot kykenevät vastustamaan fluoresenssin sammumista pienemmän pisarakoon emulsioita paremmin. Tätä teoriaa tukee myös pisarakooltaan suurempien pektiini- ja hydrofobiini-emulsioiden korkeampi fluoresenssivaste. Suuri pisarakoko tarkoittaa pienempää öljypisaroiden

yhteenlaskettua pinta-alaa, verrattuna pienen pisarakoon emulsioihin. Tällöin happi pääsee diffundoitumaan nopeammin pienen pisarakoon öljypisaroiden sisään. Hapen nopeampi kulkeutuminen öljypisaraan aiheuttaa edelleen fluoresenssin nopeamman sammumisen ja kertoo täten hapen nopeammasta diffuusiosta öljypisaran sisään. Korkean fluoresenssitason emulsiolla (pektiini-, sonikoitu kaseini- ja hydrofobiini-emulsio) hapen diffuusionopeus saattaa siis olla yhtäläinen muiden emulsioiden kanssa, mutta sitä ei havaita kuvassa 20, sillä laskenta ei ota huomioon emulsioiden pisarakokoa. Koska arabikumi-emulsion pisarakoko oli samaa luokkaa kuin pektiinillä, fluoresenssin sammuminen saattaisi olla kuvan 20 osoittamaa tasoa vieläkin matalampi, jos arabikumi-emulsion pisarakoko olisi samaa luokkaa kuin esimerkiksi hera-emulsion.

Kuvassa 21 on esitetty kahden synteettisen pinta-aktiivisen emulgaattorin normalisoidut fluoresenssivasteet ajan funktiona. Kuvan 21 käyrien keskihajonnat on esitetty taulukossa 3. Kuvasta 21 havaitaan, että pinta-aktiiviset aineet eivät ole proteiini- tai polysakkaridipohjaisia emulgaattoreita parempia estämään fluoresenssin sammumista. Kuvan perusteella pinta-aktiiviset aineet antavat keskenään hyvin samankaltaiset vasteet.

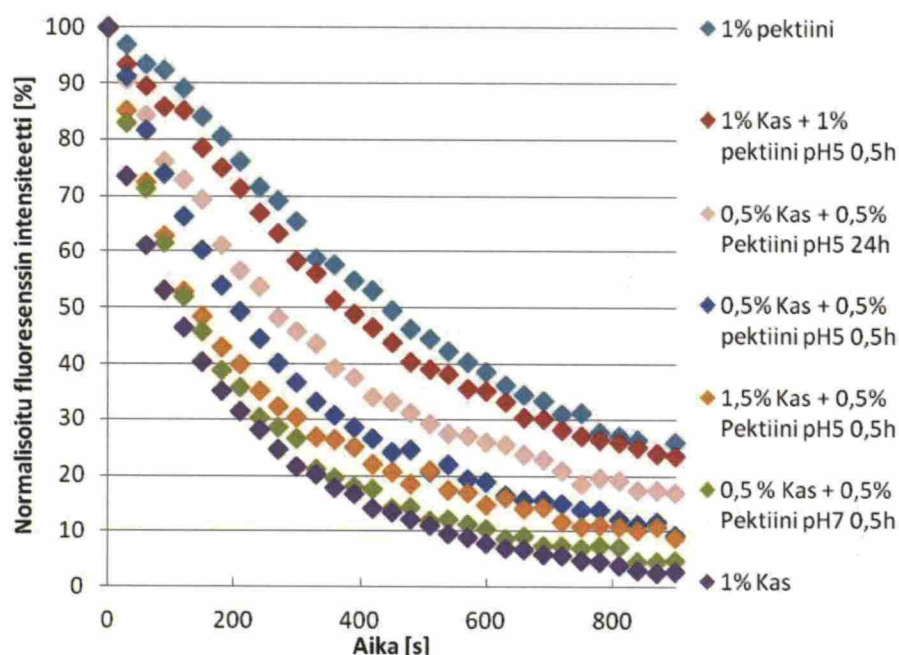


Kuva 21. Synteettisten pinta-aktiivisten emulsioiden normalisoidut fluoresenssivasteet ajan funktiona.

Tikekar *et al.* (2011) havaitsivat pinta-aktiivisten aineiden muodostavan hapen diffuusion kannalta heikompia rajapintoja kuin proteiini- ja polysakkaridipohjaiset emulsiot (normalisoitu käyrä hera-emulsiolla noin 30 prosenttiyksikköä ylempänä kuin SDS-emulsiolla). Kuvista 20 ja 21 havaitaan, että tutkimuksessa hera- ja SDS-emulsiolla on kuitenkin hyvin samankaltaiset käyrät, eron ollessa vain noin 10 prosenttiyksikköä. Samalla menetelmällä ja emulgaattoreilla toistetuilla kokeilla on siis suuri vaihtelu. Tämä saattaa merkitä menetelmän heikkoa toistettavuutta.

Hera-emulsion Tween80-emulsiota korkeampi fluoresenssitaso antaa viitteitä siitä, että synteettiset pinta-aktiiviset aineet eivät kykene muodostamaan yhtä tiiviitä/paksuja rajapintoja kuin proteiinipohjaiset emulgaattorit. Bezelgues *et al.* (2008) havaitsivat, että kaasun läpäisevyys ilma/vesi-rajapinnalla on Tween80:llä nopeampaa kuin hera-rajapinnalla. Bezelguesin *et al.* (2008) tulos tukee siis tutkimuksen tulosta siitä, että hera-emulsio hidastaa hapen diffuusiota tehokkaammin kuin Tween80-emulsio.

Pektiini-emulsion korkeamman fluoresenssitason syytä ajan funktiona haluttiin tutkia tarkemmin, jonka vuoksi valmistettiin kaseiinin ja pektiinin monikerrosemulsioita. Kuvassa 22 on esitetty monikerrostettujen kaseiini-pektiini-emulsioiden (pektiiniä inkuboitu kaseiini-emulsiossa 0,5 h tai 24 h) normalisoidut fluoresenssin intensiteetit ajan funktiona. Kuvan 22 käyrien keskihajonnat on esitetty taulukossa 3.



Kuva 22. Monikerrostamisen ja inkubointiajan (0,5 h ja 24 h) vaikutus emulsion fluoresenssitason laskuun.

Kuvasta 22 havaitaan, että pektiini-emulsio antaa monikerrosemulsoioihin verrattuna korkeamman fluoresenssivasteen. Pelkällä kaseiinilla valmistettu emulsio antaa pektiini-emulsioon verrattuna noin 20 prosenttiyksikköä pienemmän fluoresenssivasteen. Monikerrostamalla kaseiini-emulsio pektiinillä, pH:n ollessa lähellä kaseiinin isoelektristä pistettä ( $pI = 4,6$ ), emulsion rajapintaominaisuudet paranivat verrattuna pelkällä kaseiinilla valmistettuun emulsioon. pH:n ollessa noin 5, pektiini omaa anionisen eli negatiivisen varauksen. Myös kaseiinilla on kyseisessä pH-arvossa heikosti negatiivinen varaus ( $pH > pI$ ). Tutkimuksissa (Surh *et al.*, 2006, Gu *et al.*, 2004) on kuitenkin havaittu, että negatiivisesti varautuneet biopolymeerit kykenevät adsorboitumaan negatiivisesti varautuneisiin emulsiopisaroihin. Tämä johtuu siitä, että pektiini omaa anionisia karboksyyli-ryhmiä ja proteiini kationisia ryhmiä (esimerkiksi  $-NH_3^+$ ), jotka aiheuttavat polysakkaridien ja proteiinien välille paikallisia elektrostaattisia vuorovaikutuksia ja täten mahdollistavat emulsion monikerrostumisen. Tulosten perusteella voidaan siis päätellä, että pektiini-emulsion suurempi pisarakoko eli rajapinnan pienempi pinta-ala ei yksinään selitä sen



korkeampaa fluoresenssitasoa ajan funktiona, sillä monikerrosemulsioiden pisarakoko on samaa luokkaa kuin pelkällä kaseiinilla valmistettujen emulsioiden.

Monikerrostamalla kaseiini-emulsio pektiinillä pH:n ollessa neutraali, monikerrosemulsioiden fluoresenssitasossa ei havaittu muutosta verrattuna kaseiini-emulsioon. Tämä johtuu siitä, että pH:ssa 7 molemmat emulgaattorit ovat varaukseltaan negatiivisia ja pyrkivät hakeutumaan mahdollisimman kauas toisistaan, jolloin monikerrosemulsioiden rakennetta ei pääse syntymään (Surh *et al.*, 2006, Gu *et al.*, 2004). Tällöin muodostuu vain kaseiini-emulsio, jonka jatkuvassa faasissa on pektiiniä.

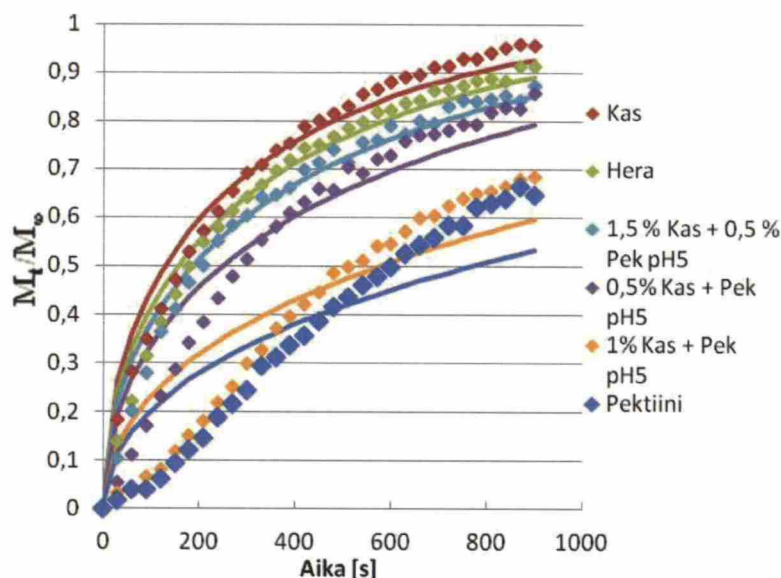
Pektiini-emulsioiden paras kyky vastustaa hapen diffuusiota öljypisaraan saattaa selittyä pektiinin kyvyllä muodostaa paksumpia ja tiiviimpiä rajapintoja. Leroux *et al.* (2003) havaitsivat, että pektiini kykenee muodostamaan keräjästä arabikumia stabiilimpia emulsioita, johtuen todennäköisesti pektiinin laajemmasta rakenteesta. Pektiini kykenee tämän vuoksi peittämään arabikumi-emulsioon verrattaessa öljypisaroita suuremmalta pinta-alalta. Tuloksista (kuva 20) havaitaan, että pektiini-emulsio kykenee vastustamaan fluoresenssin sammumista arabikumi-emulsiota paremmin. Pektiini-emulsioiden fluoresenssin hitaampi sammuminen johtuukin todennäköisesti pektiinin erinomaisesta rakenteesta rajapinnalla. Pektiinin hyvää rakennetta tukevat myös monikerrosemulsioiden saadut tulokset (kuva 22), joista havaitaan, että pektiinin lisäys kaseiini-emulsioon nostaa normalisoitua fluoresenssitasoa. 1 %:lla kaseiinin ja pektiinin monikerrosemulsiolla saadaan nimittäin aikaiseksi lähes yhtä korkealla tasolla säilyvä fluoresenssikäyrä kuin pelkällä pektiini-emulsiolla.

Fluoresenssin sammumisen ajan kuluessa havaittiin olevan erilainen eri emulsioilla. Tämän vuoksi haluttiin selvittää hapen diffuusiokerroin erilaisissa emulsioissa. Seuraavissa kolmessa luvussa on pyritty mallintamaan hapen diffuusiokerrointa kolmella erilaisella matemaattisella mallilla.

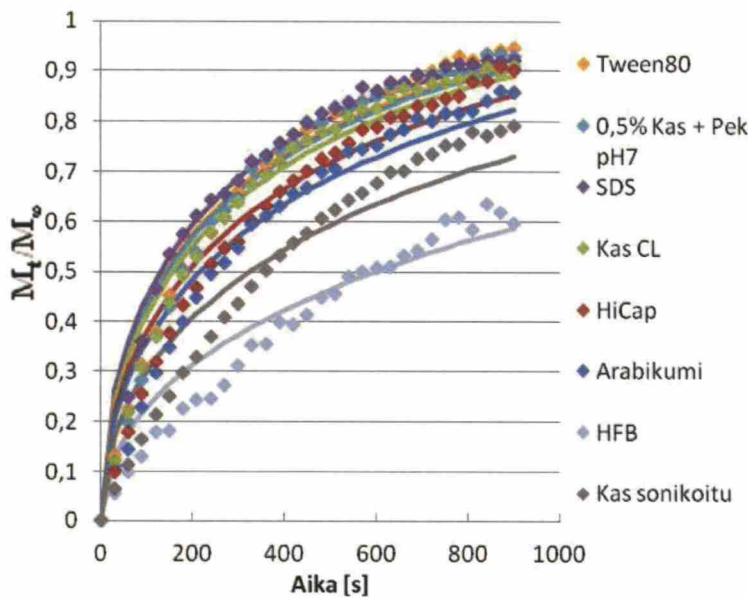
## 8.6 Hapen diffuusiokertoimen määrittäminen mallilla 1

Kaikille emulsioille määritettiin hapen diffuusiokertoimet rajapinnan läpi kahdella erilaisella mallilla, käyttämällä luvussa 7.2.6.2 esitettyjä kaavoja. Mallilla yksi lasketut hapen diffuusiokertoimet on esitetty taulukossa 4. Kuvissa 23 ja 24 on esitetty emulsioiden kokeelliset ja laskennalliset  $M_t/M_\infty$ -arvot ajan funktiona.

Kuvista 23 ja 24 havaitaan, että kokeelliset arvot eivät sovi mallilla yksi laskettuihin teoreettisiin arvoihin (PNS-arvot ilmoitettu taulukossa 4). Kuvien perusteella happiresistentimmät emulgaattorit sopivat vielä huonommin matemaattiseen malliin kuin happea nopeammin läpäisevät emulgaattorit.



Kuva 23. Mallilla yksi lasketut  $M_t/M_\infty$ -arvot ajan funktiona. Viivat ovat mallilla laskettuja arvoja ja neliöt kokeellisia arvoja ( $n=6$ ).



Kuva 24. Mallilla yksi lasketut  $M_t/M_\infty$ -arvot ajan funktiona. Viivat ovat mallilla laskettuja arvoja ja neliöt kokeellisia arvoja ( $n=6$ ).

Taulukon 4 hapen diffuusiokertoimien suuruusluokka (esimerkiksi hera-emulsiolle  $12 \cdot 10^{-15} \text{ cm}^2/\text{s}$ ) on hyvin pieni. Andrande *et al.* (2002) ja Rharbi *et al.* (1999) määrittivät hapen diffuusiokertoimeksi happea heikosti läpäisevällä kuivalla PET-muovilla (polyeteenitereftalaatti, PET)  $4\text{--}5 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ . Simon-Lukasik ja Ludescher (2004) määrittivät gelatiinikalvojen diffuusiokertoimeksi (suhteellinen kosteus 58 %)  $2 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ . Kirjallisuudessa ilmoitettujen happiresistiivisten rajapintojen hapen diffuusiokertoimet ovat siis hyvin paljon suurempia kuin emulsion rajapinnan läpi tapahtuva hapen diffuusio. Tutkimuksen tulokset eivät siis ole uskottavia, sillä hapen diffuusio emulgaattorirajapinnan läpi tulisi olla nopeampaa kuin hapen diffuusio kiinteiden PET- tai gelatiinikalvojen läpi.

Taulukko 4. Hapen diffuusiokertoimet erilaisten rajapintojen läpi ja pienimmän neliösumman -arvot (PNS) laskettuna mallilla yksi sekä emulsioiden pisarakoot.

Emulsio	D ( $\cdot 10^{-15} \text{ cm}^2/\text{s}$ )	PNS	Pisarakoko [nm]
1 % Kas + 1 % Pek pH5	4,4	0,2704	178
1,5 % Kas + 0,5 % Pek pH5	8,6	0,0537	153
0,5 % Kas + 0,5 % Pek pH5	8,6	0,1539	166
Tween80	11,6	0,0746	147
HiCap	12,0	0,0908	172
Hera	12,0	0,0483	157
SDS	12,2	0,0518	144
Kas CL	12,9	0,0595	166
0,5 % Kas + 0,5 % Pek pH7	14,5	0,0962	167
Pektiini	14,9	0,2931	386
Kaseiini	15,9	0,0481	164
Arabikumi	83,5	0,0937	489
Kas sonikoitu	2000	0,1354	2920
HFB	6500	0,0936	6653

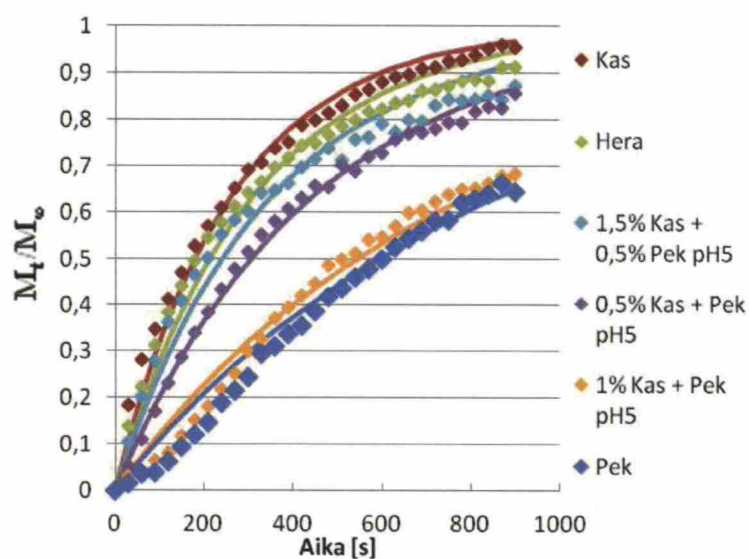
Tikekar *et al.* (2011) määrittivät tutkimusta vastaavalla menetelmällä hapen diffuusiokertoimeksi hera-rajapinnalla  $140 \cdot 10^{-15} \text{ cm}^2/\text{s}$ . Hapen diffuusiokertoimen arvo hera-rajapinnalla oli tässä tutkimuksessa kertaluokkaa pienempi kuin Tikekar *et al.* tutkimuksessa. Tikekar *et al.* määrittämä diffuusiokerroin on myös hyvin pieni verrattuna kiinteisiin happea pidättäviin kalvoihin, jonka vuoksi vertailu tutkimuksen tuloksiin ei ole mielekäästä. Mallilla yksi määritetyt diffuusiokertoimet ovat siis liian pieniä ollakseen teoreettisesti mahdollisia. Mallin yksi voidaan siis todeta ennustavan hyvin heikosti hapen diffuusion todellista määrää rajapinnan läpi. Mallin yksi heikkous on myös se, että malli ennustaa hapen diffuusiota öljypisaran rajapinnasta öljypisaran keskipisteeseen. Malli yksi antaa siis tulokseksi rajapinnan ja öljypisaran yhteenlasketun diffuusiokertoimen, eikä täten kuvaa vain tutkittavan rajapinnan ominaisuuksia.

## 8.7 Hapen diffuusiokertoimen määrittäminen mallilla 2

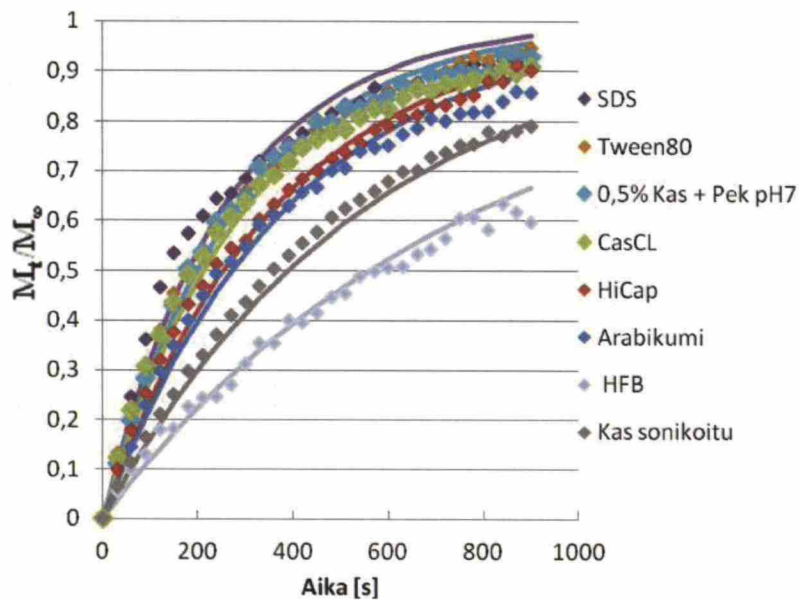
Hapen diffuusiokertoimet emulsioiden rajapintojen läpi määritettiin myös käyttämällä luvussa 7.2.6.2 esitettyä mallin kaksi kaavaa (yhtälö 25). Malli kaksi mallintaa siis emulsion rajapinnan läpi tapahtuvaa hapen diffuusiota. Mallilla kaksi lasketut hapen diffuusiokertoimet on esitetty taulukossa 5. Kuvissa 25 ja 26 on



esitetty emulsioiden kokeelliset ja laskennalliset  $M_t/M_\infty$ -arvot ajan funktiona. Laskennassa kaikkien emulgaattoreiden rajapintojen paksuudeksi on oletettu 10 nm. Kuvista 25 ja 26 sekä taulukon 5 PNS-arvoista (PNS-arvot mallilla kaksi on pienempiä kuin mallilla yksi) havaitaan, että malli kaksi sopii kokeellisiin tuloksiin mallia yksi paremmin. Malli kaksi selittää siis paremmin kokeellisten tulosten vaihtelua kuin malli yksi. Malli kaksi antaa kuitenkin lähes yhtä pieniä diffuusiokertoimia kuin malli yksi.



Kuva 25. Mallilla kaksi sovitettua  $M_t/M_\infty$ -arvot ajan funktiona erilaisille emulsioille. Viivat ovat mallilla laskettuja arvoja ja neliöt kokeellisia arvoja (n=6).



Kuva 26. Mallilla kaksi sovitettua  $M_t/M_\infty$ -arvoa erilaisille emulsioille. Viivat ovat mallilla laskettuja arvoja ja neliöt kokeellisia arvoja ( $n=6$ ).

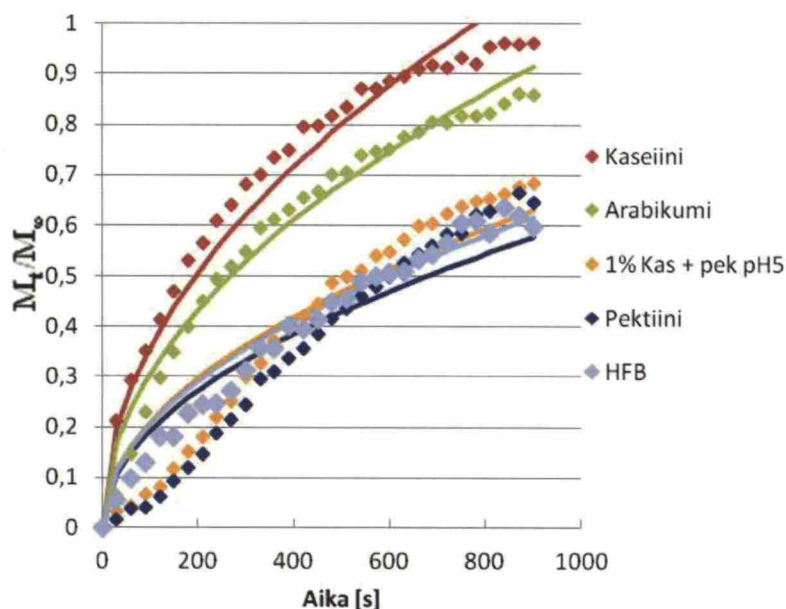
Taulukosta 5 havaitaan, että hapen diffuusiokertoimet ovat edelleen hyvin pieniä (noin  $6 \cdot 10^{-15} \text{ cm}^2/\text{s}$ ), eli vieläkin pienempiä kuin mallilla yksi määritetyt hapen diffuusiokertoimet. Vaikka malli kaksi sopiikin kokeellisiin tuloksiin mallia yksi paremmin, eivät hapen diffuusiokertoimet ole edelleenkaan kirjallisuuden diffuusiokertoimiin verrattaessa uskottavia.

Taulukko 5. Hapen diffuusiokertoimet erilaisten rajapintojen läpi ja PNS-arvot laskettuna mallilla kaksi sekä emulsioiden pisarakoot.

Emulgaattori	Malli 2: $D \cdot 10^{-15} \text{ cm}^2/\text{s}$	PNS	Pisarakoko [nm]
1 % Kas + 1 % Pek pH5	3,1	0,0348	178
0,5 % Kas + 0,5 % Pek pH5	4,9	0,0140	166
1,5 % Kas + 0,5 % Pek pH5	5,2	0,0652	153
HiCap	6,2	0,0461	172
Pektiini	6,8	0,0436	386
Tween80	6,4	0,0173	147
Hera	6,5	0,0461	157
SDS	7,0	0,0631	144
kas + CL	6,9	0,0332	166
0,5 % Kas + 0,5 % Pek pH7	7,5	0,0461	167
Kas	8,2	0,0461	164
Arabikumi	19	0,0248	489
Kaseiini sonikoitu	47	0,0229	2920
HFB	140	0,0265	6653

### 8.8 Hapen diffuusiokertoimen määrittäminen mallilla 3

Luvuissa 8.6 ja 8.7 esitetyt matemaattiset mallit eivät kuvanneet kokeissa esiintyvää hapen diffuusiota oikealla tavalla, sillä diffuusiokertoimet olivat liian pieniä verrattaessa esimerkiksi happiresistiiviseen PET-muoviin. Tämän vuoksi selvitettiin olisiko mahdollista, että menetelmä mittasikin hapen diffuusiota liuoksessa, eli diffuusiota, jossa rajapinta ei ole rajoittavana tekijänä. Emulsiolle määritettiin diffuusiokertoimet käyttämällä luvussa 7.2.6.2 esitettyä mallin kolme yhtälöä (yhtälö 30). Emulsiokerroksen paksuudeksi kuoppalevyssä määritettiin 6,3 mm, kun näytettä oli 200 µl. Mallin kolme sovitusta viidelle erilaiselle emulsiolle on esitetty kuvassa 27. Emulsiot esittävät diffuusio-ominaisuuksiltaan emulsioiden ääripäitä.



Kuva 27. Mallin kolme sovitus viidelle erilaiselle emulsioille. Viivat kuvaavat laskennallisia ja neliöt kokeellisia tuloksia (n=6).

Kuvasta 27 havaitaan, että kaikkien kolmen mallin emulsioiden kokeelliset ja laskennalliset  $M_t/M_\infty$ -arvot käyttäytyvät samalla tavalla suhteessa toisiinsa. Kaseiini-emulsioon kulkeutuu mallin kolme mukaan edelleen eniten happea ja pektiini- ja HFB-emulsioihin heikoiten. Kuvan 27 perusteella kokeelliset tulokset eivät sovi kovinkaan hyvin matemaattiseen malliin. Tämä havaitaan etenkin emulgaattoreilla, jotka vaikuttivat rajoittavan paremmin hapen diffuusiota liuoksessa. Taulukossa 6 on esitetty mallilla kolme lasketut diffuusiokertoimet ja PNS-arvot 13 eri emulsioille. Taulukosta 6 havaitaan, että kaikkien emulsioiden hapen diffuusiokerroin on hyvin samaa luokkaa ( $1-4 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$ ).



Taulukko 6. Hapen diffuusiokertoimet liuoksessa ja pienimmän neliösumman -arvot (PNS) laskettuna mallilla kolme.

Emulgaattori	D [ $\cdot 10^{-4}$ cm <sup>2</sup> /s]	PNS
1 % Kas + 1 % Pek pH5	1,0	0,3749
Pektiini	1,2	0,4187
HFB	1,4	0,1018
Kas sonikoitu	2,2	0,1052
0,5 % Kas + 0,5 % Pek pH5	2,6	0,1390
Arabikumi	2,9	0,0836
HiCap	3,2	0,0619
1,5 % Kas + 0,5 % Pek pH5	3,2	0,1560
Hera	3,5	0,1349
Kas CL	3,5	0,1325
Tween80	3,8	0,1101
SDS	3,9	0,2818
Kaseiini	4,0	0,1440

Lineaarisella mallilla hapen diffuusio kaseiini-emulsiossa oli  $4,0 \cdot 10^{-4}$  cm<sup>2</sup>/s. Diffuusiokerroin on siis yli kymmenen kertaluokkaa suurempi kuin malleilla yksi ja kaksi lasketut diffuusiokertoimet. Kirjallisuudessa hapen diffuusioksi vedessä on esitetty noin  $2 \cdot 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/s (Pénicaud *et al.*, 2012). Tutkimuksen tulos on siis samaa suuruusluokkaa kuin kirjallisuuden arvo hapen diffuusiolle vesifaasissa. Tutkimuksessa havaittu diffuusionopeus on kuitenkin hieman kirjallisuuden arvoa nopeampaa. Tämä on ristiriitainen tulos, sillä proteiini-liuoksen pitäisi viskositeetiltaan vettä paksumpana hidastaa hapen diffuusiota eikä nopeuttaa sitä. Tämä voi selittyä sillä, että jatkuva faasi on emulsion pipetoinnin aikana jo osittain ilmastunut, eikä lähtötilanne olekaan täysin hapeton. Tällöin happea on jatkuvassa faasissa jo alkutilanteessa, jolloin hapen kulkeutuminen öljypisaroihin nopeutuu. Tämä saattaa olla myös syy siihen, miksi mallin kolme laskennalliset arvot eivät sopineet hyvin kokeellisiin tuloksiin.

Einsteinin yhtälöllä (yhtälö 3) laskettuna hapen diffuusio vedessä 0,63 cm matkalla kestää noin 9000 sekuntia, kun hapen diffuusiokerroin vedessä on  $2 \cdot 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/s. Tämä tarkoittaa, että mittausmenetelmässä fluoresenssi olisi sammunut ilmastetun näytteen tasolle 9000 sekuntia typetyksen loppumisesta. Työssä kaseiini-emulsion fluoresenssi sammui noin 98 %:sti 1020 sekunnin kohdalla (900 sekuntia

mittausaikaa ja 120 sekuntia typetyksen loppumisesta mittauksen alkuun). Tämä tulos tukee sitä, että emulsiot sisälsivät jo mittauksen alkaessa happea, jonka vuoksi hapen diffuusio öljypisaraan ja fluoresenssin sammuminen on teoreettista arvoa nopeampaa.

Mikäli hapen diffuusiokerroin emulsion rajapinnan läpi olisi PET-muovin suuruusluokkaa eli noin  $10^{-9}$  cm<sup>2</sup>/s, hapelta kuluisi diffundoitua Einsteinin yhtälön mukaan (yhtälö 3) 10 nm:n paksuisen rajapinnan yli noin 500 µs. Koska hapen diffuusio rajapinnan läpi olisi tässä tapauksessa hyvin nopeaa, ei tutkimuksessa käytetyllä mittausmenetelmällä voida havaita näin lyhyessä ajassa tapahtuvaa muutosta.

## 9 Johtopäätökset

Diplomityön tavoitteena oli pystyttää reaaliaikainen mittausmenetelmä hapen diffuusiokertoimen määrittämiseksi emulsion rajapinnan läpi fluoresoivan happisensitiivisen fluorokromin avulla. Pystytetyllä mittausmenetelmällä mitattiin 14 erilaisen biopolymeeripohjaisen ja synteettisen emulsion kykyä hidastaa fluoresenssin sammumista. Hapen diffuusiokertoimet rajapinnan läpi määritettiin kaikissa emulsioissa kahdella erilaisella matemaattisella mallilla. Lisäksi määritettiin hapen lineaarinen diffuusio liuosfaasin pinnalta pohjalle.

Hapen diffuusio erilaisissa emulsioissa määritettiin fluoresenssin sammumisen mittaamiseen perustuvalla menetelmällä. Mittausmenetelmän pystytyksessä näytetilavuudella ei havaittu olevan suurta vaikutusta fluoresenssin sammumiseen. Tutkimuksessa päädyttiin käyttämään 200 µl näytetilavuutta. Typetysajan havaittiin vaikuttavan emulsion fluoresenssisitasoon ja keskihajontaan. Typetysajalla 60 minuuttia saavutettiin hajonnaltaan ja intensiteetiltään optimaalisin fluoresenssi. Näytteiden sekoittamisella ennen mittauksen aloitusta ei havaittu olevan vaikutusta fluoresenssin sammumiseen, jonka vuoksi sekoitus jätettiin pois. Sekoituksen merkitsemättömyys fluoresenssin sammumiseen eli hapen diffuusion oli

ristiriidassa kirjallisuuden kanssa. Kirjallisuuden mukaan sekoituksen tulisi nopeuttaa aineensiirtoa liuoksessa (Dotto ja Pinto, 2011).

Hapen diffuusiokerrointa öljy vedessä –emulsiossa määritettiin kahdella erilaisella matemaattisella mallilla. Fickin lakiin perustuvat mallit yksi ja kaksi antoivat hapen diffuusiokertoimiksi hyvin pieniä tuloksia (kaseiini-emulsiossa mallilla yksi  $16 \cdot 10^{-15} \text{ cm}^2/\text{s}$  ja mallilla kaksi  $6 \cdot 10^{-15} \text{ cm}^2/\text{s}$ ) verrattaessa tuloksia kirjallisuudessa esiintyvään hapen diffuusiokertoimeen PET-kalvossa ( $5 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ ) (Andrande *et al.* 2002). Mallin yksi heikkoutena havaittiin olevan se, että malli ennusti hapen diffuusiota öljypisaran rajapinnasta öljypisaran keskipisteeseen. Mallilla kaksi pyrittiin korjaamaan mallin yksi diffundoitumisrajoja niin, että malli kaksi määrittäisi hapen diffuusiokertoimen vain emulsion rajapinnan läpi. Diffuusiokertoimien laskemiseen mallilla kaksi tarvittiin tieto emulsion rajapintojen paksuudesta. Koska kirjallisuudesta löytyi vain muutamien emulgaattoreiden muodostamien rajapintojen paksuudet, oletettiin kaikkien rajapintojen olevan saman paksuiset. Tästä oletuksesta aiheutui virhettä mallin kaksi diffuusiokertoimien arvoihin. Tämän vuoksi työssä tarkasteltiin laskennallisesti rajapintojen paksuuden vaikutusta diffuusiokertoimien arvoihin. Rajapinnan paksuuden kasvamisella havaittiin olevan diffuusiokertoimen arvoon kasvava vaikutus. Laskennallisesti rajapinnan paksuuden vaihdellessa 0,1-100 nm:n välillä, diffuusiokerroin kasvoi noin kahdella kertaluokalla. Koska rajapinnan paksuuden vaikutus diffuusiokertoimien arvoihin oli kuitenkin niin pieni, ei rajapinnan arvon muutoksilla olisi saatu kirjallisuutta tukevia tuloksia.

Hapen diffuusiokertoimen määrittäminen mallilla kolme perustui hapen lineaariseen diffuusioon liuoksessa, kuoppalevyssä olevan emulsion pinnalta pohjalle. Malli kolme oletti hapen diffuusion olevan emulsiossa lineaarista, jolloin rajapinta ei vaikuttanut diffuusiokertoimen arvoon. Hapen diffuusiokertoimeksi kaseiini-emulsiossa saatiin mallilla kolme  $4 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$ . Tutkimuksessa määritetty hapen diffuusiokertoimen arvo on samaa suuruusluokkaa kuin kirjallisuudessa ilmoitettu hapen diffuusiokerroin vesiliuoksessa ( $2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ ) (Pénicaud *et al.*, 2012). Hapen diffuusiokertoimen havaittiin olevan kirjallisuuden arvoa pienempi, jonka pääteltiin johtuvan muun muassa hapen alkukonsentraatiosta emulsiossa. Diffuusiokertoimien



suuruusluokkien ja kirjallisuuden perusteella tehtiin johtopäätös, että pystytetty menetelmä mittasi todennäköisesti hapen diffuusiota liuoksessa eikä rajapinnalla.

Pektiini- ja hydrofobiini-emulsioiden, sonikoidun kaseiini-emulsion sekä kaseiinin ja pektiinin monikerrosemulsioiden (pH 5) havaittiin muodostavan kaikkein parhaiten fluoresenssin sammumista hidastavat emulsiot. Pisarakoon havaittiin korreloivan kaseiini-emulsion fluoresenssivasteen suhteen, pienemmän pisarakoon antaessa pienempiä fluoresenssivasteita. Monikerrosemulsioissa pisarakoko ei kuitenkaan enää selittänyt kasvanutta fluoresenssivastetta. Tutkimuksessa jäikin epäselväksi, mitkä tekijät vaikuttivat emulsioiden erilaisiin fluoresenssitasoniin, kun rajapinnan ominaisuuksien todettiin olevan merkityksettömiä hapen diffuusiolle tutkimuksessa käytetyllä aikaskaalalla. Rajapintojen vähäinen merkitys hapen diffuusioon johtui siitä, että muodostuneet rajapinnat olivat niin ohuita (noin 10 nm). Tällöin hapen diffuusio rajapinnan läpi tapahtuu Einsteinin yhtälön perusteella (yhtälö 3) hyvin lyhyessä ajassa (noin 500  $\mu$ s), kun hapen diffuusiokerroin rajapinnalla oletetaan olevan samaa suuruusluokkaa kuin hapen diffuusiokerroin PET-muovin ja gelatiinikalvon läpi (noin  $10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/s). Lisäksi pienikokoisen hapen atomisäteen ollessa vain noin 60 pm (Slater, 1964), hapen diffuusio ei todennäköisesti juuri hidastu rajapinnan ominaisuuksista huolimatta (Tikekar ja Nitin, 2012).

Työn tuloksiin on mahdollisesti aiheutunut virhettä emulsion typetyksen ja mittauksen aloittamisen aikana. Mikäli typetyks ei ole ollut tarpeeksi tehokasta, emulsioita ei ole saatu täysin hapettomaan tilaan. Lisäksi emulsion siirtämisessä typetyspullosta fluoresenssimittaukseen tarkoitettulle kuoppalevyille, emulsio täytyi pipetoida. Pipetoinnin aikana emulsioon siirtyi väistämättä happea. Typetyksen lopettamisen ja mittauksen aloittamisen välisessä ajassa (2 min) hapen diffuusio emulsioon pääsi alkamaan, jolloin mittaukset eivät alkaneet täysin hapettomasta tilasta. Mittauksen suorittamiseksi ei siis kyetty luomaan olosuhteita, joissa emulsion alkukonsentraatio mittauksen alussa olisi ollut nolla, joka on todennäköisesti aiheuttanut virhettä myös diffuusiokerroimien määrittämisessä. Diffuusioon perustuvassa laskennassa alkukonsentraatio oletetaan nolaksi. Tutkimuksen tulosten



ja kirjallisuuden ristiriitaisuuden perusteella pääteltiin, että mittaustapahtumaa tai hapen diffuusiota liuokseen ei kyetty täysin ymmärtämään.

Rajapintojen läpäisevyysominaisuuksien tunteminen on olennaista emulsion hapettumismekanismin selvittämisessä. Työssä pystytetyllä menetelmällä ei kyetty vertailemaan erilaisten rajapintojen läpi tapahtuvaa hapen diffuusiota, hapen diffuusion ollessa niin nopeaa rajapinnan yli. Rajapinta kykenee todennäköisesti kuitenkin vastustamaan etenkin pro-oksianttien kulkua vesifaasista öljypisaraan (Moska *et al.*, 2013; Waharo *et al.*, 2010a; Hu *et al.*, 2003; Kargar *et al.*, 2011a). Rajapinnan ominaisuuksien tutkimuksessa voitaisiin käyttää tulevissa tutkimuksissa esimerkiksi pro-oksianttien diffuusion mittaamista rajapinnan läpi (Tikekar *et al.*, 2011b). Näin voitaisiin saada aikaiseksi potentiaalinen menetelmä selvittää erilaisten rajapintojen merkitystä hapettumisen käynnistymiseen ja rajoittamiseen.

## 10 Läheteet

Anon., *Microfluidizer® Processor user guide, Innovation through microfluidizer processor technology*, Newton, USA 2008, 11 s.

Anon., Perkin Elmer, *User Manual Wallac 1420*, Turku 2000, 155 s.

Anton, M. ja Gandemer, G., Effect of pH on interface composition and on quality of oil-in-water emulsions made with hen egg yolk, *Colloids Surf. B.* **12** (1999) 351-358.

Berdahl, D.R., Nahas, R.I. ja Kalsec, J.P.B., Synthetic and natural antioxidant additives in food stabilization: current applications and future research, Teoksessa *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications, Volume 1 - Understanding Mechanisms of Oxidation and Antioxidant Activity*, toim. Decker, E.A., Elias, R.J. ja McClements, D.J., Woodhead Publishing, USA 2010, ss. 274-275.

Berton, C., Ropers, M.H., Viau, M. ja Genot, C., Contribution of the interfacial layer to the protection of emulsified lipids against oxidation, *J. Agric. Food Chem.* **59** (2011) 5052-5061.

Berton, C., Ropers, M.H., Bertrand, D., Viau, M. ja Genot, C., Oxidative stability of oil-in-water emulsions stabilised with protein or surfactant emulsifiers in various oxidation conditions, *Food Chem.* **131** (2012) 1360-1369.

Bezelgues, J.B., Serieye, S., Crosset-Perrotin, L. ja Leser, M.E., Interfacial and foaming properties of some food grade low molecular weight surfactants, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects* **331** (2008) 56-62.

Bing, L., Jie, C. ja Wenshui, X., Mathematical Modeling of the Oxidation of Polyunsaturated Fatty Acids in Emulsions with Stirring and Limited Oxygen Compensation, *Chin. J. Chem. Eng.* **16** (2008) 218-222.

Bönisch, M.P., Huss, M., Weitzl, K. ja Kulozik, U., Transglutaminase cross-linking of milk proteins and impact on yoghurt gel properties, *Int. Dairy J.* **17** (2007) 1360-1371.

Boon, C.S., Xu, Z., Xue, X., McClements, D.J., Weiss, J. ja Decker, E.A., Factors Affecting Lycopene Oxidation in Oil-in-Water Emulsions, *J. Agric. Food Chem.* **56** (2008) 1408-1414.

Bouyer, E., Mekhloufia, G., Rosilio, V., Grossiorda, J.L. ja Agnely, F., Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives

to synthetic surfactants in the pharmaceutical field?, *Int. J. Pharm.* **436** (2012) 359-378.

Cooper, A., *Biophysical Chemistry*, 2. painos, Royal Society of Chemistry Publishing, Cambridge 2011, ss. 57.

Coupland, J. ja McClements, D.J., Lipid oxidation in food emulsions, *Trends Food Sci. Technol.* **7** (1996) 83-91.

Crittenden, J.C., Trussell, R.R., Hand, D.W., Howe, K.J. ja Tchobanoglous, G., *MWH's Water Treatment - Principles and Design*, 3. painos, John Wiley & Sons, New Jersey 2012, ss. 396-404.

Damodaran, S., Protein Stabilization of Emulsions and Foams, *J. Food Sci.* **70** (2005) R54-R66.

Dani, A., Guiraud, P. ja Cockx, A., Local measurement of oxygen transfer around a single bubble by planar laser-induced fluorescence, *Chemical Engineering Science* **62** (2007) 7245-7252.

Dickinson, E., Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers, *Food Hydrocolloids* **23** (2009) 1473-1482.

Dotto, G.L. ja Pinto, L.A.A., Adsorption of food dyes acid blue 9 and food yellow 3 onto chitosan: Stirring rate effect in kinetics and mechanism, *J. Hazard. Mater.* **187** (2011) 164-170.

Drusch, S. ja Schwarz, K., Microencapsulation properties of two different types of n-octenylsuccinate-derivatised starch, *European Food Research and Technology* **222** (2006) 155-164.

Drusch, S., Sugar beet pectin: A novel emulsifying wall component for microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray-drying, *Food Hydrocoll.* **21** (2007) 1223-1228.

Early, R., *The technology of dairy products*, Blackie academic & professional, London 1998, ss. 398-398.

El-Sayed, M.M.H. ja Chase, H.A., Trends in whey protein fractionation, *Biotechnol. Lett.* **33** (2011) 1501-1511.

Elzoghby, A.O., Abo El-Fotoh, W.S. ja Elgindy, N.A., Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems, *J. Controlled Release* **153** (2011) 206-216.

Færgemand, M., Otte, J. ja Qvist, K.B., Emulsifying Properties of Milk Proteins Cross-linked with Microbial Transglutaminase, *Int. Dairy J.* **8** (1998) 715-723.

Faraji, H., McClements, D.J. ja Decker, E.A., Role of Continuous Phase Protein on the Oxidative Stability of Fish Oil-in-Water Emulsions, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 4558-4564.

Floury, J., Desrumaux, A. ja Lardières, J., Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions, *Innovative Food Science and Emerging Technology* **1** (2000) 127-134.

Gu, Y.S., Decker, E.A. ja McClements, D.J., Influence of pH and Î<sup>1</sup>-Carrageenan Concentration on Physicochemical Properties and Stability of Î<sup>2</sup>-Lactoglobulin-Stabilized Oil-in-Water Emulsions, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 3626-3632.

Guzey, D. ja McClements, D.J., Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry, *Adv. Colloid Interface Sci.* **128-130** (2006) 227-248.

Hektor, H.J. ja Scholtmeijer, K., Hydrophobins: proteins with potential, *Curr. Opin. Biotechnol.* **16** (2005) 434-439.

Herman, B., *Fluorescence Microscopy*, Taylor and Francis Group, New York 1998, ss. 1-5.

Horn, A.F., Nielsen, N.S., Jensen, L.S., Horsewell, A. ja Jacobsen, C., The choice of homogenisation equipment affects lipid oxidation in emulsions, *Food Chem.* **134** (2012) 803-810.

Hornero-Méndez, D., Pérez-Gálvez, A. ja Míguez-Mosquera, M.I., A rapid spectrophotometric method for the determination of peroxide value in food lipids with high carotenoid content, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **78** (2001) 1151-1155.

Hu, M., McClements, D.J. ja Decker, E.A., Lipid Oxidation in Corn Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Casein, Whey Protein Isolate, and Soy Protein Isolate, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 1696-1700.

Hu, M., Decker, E.A. ja McClements, D.J., Emulsion Technologies to Produce Oxidative Stable Emulsions Containing n-3 Fatty Acids, Teoksessa *Healthful Lipids*, toim. Akoh, C.C. ja Lai, O., AOCS Press, Amherst 2005, ss. 547-557.

Kargar, M., Spyropoulos, F. ja Norton, I.T., Microstructural design to reduce lipid oxidation in oil-in-water emulsions, *Procedia Food Science* **1** (2011a) 104-108.

Kargar, M., Spyropoulos, F. ja Norton, I.T., The effect of interfacial microstructure on the lipid oxidation stability of oil-in-water emulsions, *J. Colloid Interface Sci.* **357** (2011b) 527-533.



Kellerby, S.S., Gu, Y.S., McClements, D.J. ja Decker, E.A., Lipid Oxidation in a Menhaden Oil-in-Water Emulsion Stabilized by Sodium Caseinate Cross-Linked with Transglutaminase, *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006a) 10222-10227.

Kellerby, S.S., McClements, D.J. ja Decker, E.A., Role of proteins in Oil-in-water emulsions on the stability of lipid hydroperoxides, *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006b) 7879-7884.

Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., McClements, D.J. ja Decker, E.A., Increasing the Oxidative Stability of Liquid and Dried Tuna Oil-in-Water Emulsions with Electrostatic Layer-by-Layer Deposition Technology, *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005) 4561-4566.

Kluge, J., Muhrer, G. ja Mazzotti, M., High pressure homogenization of pharmaceutical solids, *J. of Supercritical Fluids* **66** (2012) 380-388.

Kuhn, K.R. ja Cunha, R.L., Flaxseed oil – Whey protein isolate emulsions: Effect of high pressure homogenization, *J. Food Eng.* **111** (2012) 449-457.

Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer, New York 2006, ss. 27-61.

Lantto, R., Puolanne, E., Kalkkinen, N., Buchert, J. ja Autio, K., Enzyme-Aided Modification of Chicken-Breast Myofibril Proteins: Effect of Laccase and Transglutaminase on Gelation and Thermal Stability, *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005) 9231-9237.

László, M., János, S. ja Attila, J., Steady-state fluorescence quenching applications for studying protein structure and dynamics, *J. Photochem. Photobiol. B.* **83** (2006) 223-236.

Leroux, J., Langendorff, V., Schick, G., Vaishnav, V. ja Mazoyer, J., Emulsion stabilizing properties of pectin, *Food Hydrocoll.* **17** (2003) 455-462.

Linder, M., Selber, K., Nakari-Setälä, T., Qiao, M., Kula, M. ja Penttilä, M., The Hydrophobins HFBI and HFBII from *Trichoderma reesei* Showing Efficient Interactions with Nonionic Surfactants in Aqueous Two-Phase Systems, *Biomacromolecules* **2** (2001) 511-517.

Linder, M.B., Hydrophobins: Proteins that self assemble at interfaces, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **14** (2009) 356-363.

Littoz, F. ja McClements, D.J., Bio-mimetic approach to improving emulsion stability: Cross-linking adsorbed beet pectin layers using laccase, *Food Hydrocolloids* **22** (2008) 1203-1211.

Lumsdon, S.O., Green, J. ja Stieglitz, B., Adsorption of hydrophobin proteins at hydrophobic and hydrophilic interfaces, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **44** (2005) 172-178.

Ma, H., Forssell, P., Partanen, R., Buchert, J. ja Boer, H., Improving Laccase Catalyzed Cross-Linking of Whey Protein Isolate and Their Application as Emulsifiers, *J. Agric. Food Chem.* **59** (2011) 1406-1414.

Ma, H., Forssell, P., Kylli, P., Lampi, A.M., Buchert, J., Boer, H. ja Partanen, R., Transglutaminase Catalyzed Cross-Linking of Sodium Caseinate Improves Oxidative Stability of Flaxseed Oil Emulsion, *J. Agric. Food Chem.* **60** (2012) 6223-6229.

Mancuso, J.R., McClements, D.J. ja Decker, E.A., Iron-Accelerated Cumene Hydroperoxide Decomposition in Hexadecane and Trilaurin Emulsions, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 213-219.

Manning, T.J. ja Sontheimer, H., Recording of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ , pH and membrane potential in cultured astrocytes using a fluorescence plate reader, *J. Neurosci. Methods* **91** (1999) 73-81.

McClements, D., *Food emulsions. Principles, practice and techniques*, CRC Press, New York 1999, ss. 378.

McClements, D.J. ja Decker, E.A., Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems, *J. Food Sci.* **65** (2000) 1270-1282.

McClements, D.J. ja Weiss, J., Lipid Emulsions, Teoksessa *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 6. painos, toim. Shahidi, F., John Wiley & Sons, New Jersey 2005, ss. 466.

McNamara, K.P. ja Rosenzweig, Z., Dye-Encapsulating Liposomes as Fluorescence-Based Oxygen Nanosensors, *Anal. Chem.* **70** (1998) 4853-4859.

Miller, C.C., The Stokes-Einstein Law for Diffusion in Solution, *Proc. R. Soc. Lond. A.* **106** (1924) 724-749.

Partanen, R., Forssell, P., Mackie, A. ja Blomberg, E., Interfacial cross-linking of  $\beta$ -casein changes the structure of the adsorbed layer, *Food Hydrocoll.* **32** (2013) 271-277.

Pénicaud, C., Peyron, S., Gontard, N. ja Guillard, V., Oxygen Quantification Methods and Application to the Determination of Oxygen Diffusion and Solubility Coefficients in Food, *Food Rev. Int.* **28** (2012) 113-145.

Phillips, G.O. ja Williams, P.A., *Handbook of Hydrocolloids*, 2. painos, Woodhead Publishing, UK 2009, ss. 267-268.

Raikos, V., Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. A review, *Food Hydrocolloids* **24** (2009) 259-265.

Reger, M., Sekine, T., Okamoto, T. ja Hoffmann, H., Unique emulsions based on biotechnically produced hydrophobins, *Soft matter* **7** (2011) 8248-8257.

Rharbi, Y., Yekta, A. ja Winnik, M.A., A Method for Measuring Oxygen Diffusion and Oxygen Permeation in Polymer Films Based on Fluorescence Quenching, *Anal. Chem.* **71** (1999) 5045-5053.

Ries, D., Ye, A., Haisman, D. ja Singh, H., Antioxidant properties of caseins and whey proteins in model oil-in-water emulsions, *Int. Dairy J.* **20** (2010) 72-78.

SanGiovanni, J.P. ja Chew, E.Y., The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina, *Prog. Retin. Eye Res.* **24** (2005) 87-138.

Schomburg, W.K., Diffusion, *Introduction to Microsystem Design* **1** (2011) 191-201.

Simon-Lukasik, K.V. ja Ludescher, R.D., Erythrosin B phosphorescence as a probe of oxygen diffusion in amorphous gelatin films, *Food Hydrocoll.* **18** (2004) 621-630.

Slater, J., Atomic radii in crystals, *J. Chem. Phys.* **41** (1964) 3199-3204.

Sliwinski, E.L., Roubos, P.J., Zoet, F.D., van Boekel, M.A. ja Wouters, J.T., Effects of heat on physicochemical properties of whey protein-stabilised emulsions, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **31** (2003) 231-242.

Sootitnantawat, A., Bigeard, F., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M. ja Linko, P., Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated d-limonene by spray drying, *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **6** (2005) 107-114.

Sun, Y.E., Wang, W.D., Chen, H.W. ja Li, C., Autoxidation of Unsaturated Lipids in Food Emulsion, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **51** (2011) 453-466.

Surh, J., Decker, E.A. ja McClements, D.J., Influence of pH and pectin type on properties and stability of sodium-caseinate stabilized oil-in-water emulsions, *Food Hydrocoll.* **20** (2006) 607-618.

Taylor, P., Ostwald ripening in emulsions, *Adv. Colloid Interface Sci.* **75** (1998) 107-163.



Tikekar, R.V., Johnson, A. ja Nitin N., Real-time measurement of oxygen transport across an oil–water emulsion interface, *J. Food Eng.* **103** (2011) 14-20.

Tikekar, R.V., Johnson, A. ja Nitin, N., Fluorescence imaging and spectroscopy for real-time, in-situ characterization of interactions of free radicals with oil-in-water emulsions, *Food Res. Int.* **44** (2011b) 139-145.

Tikekar, R.V. ja Nitin, N., Distribution of Encapsulated Materials in Colloidal Particles and Its Impact on Oxidative Stability of Encapsulated Materials, *Langmuir* **28** (2012) 9233-9243.

Villiere, A., Viau, M., Bronnec, I., Moreau, N. ja Genot, C., Oxidative Stability of Bovine Serum Albumin- and Sodium Caseinate-Stabilized Emulsions Depends on Metal Availability, *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005) 1514-1520.

Waharo, T., Cardenia, E.A., Decker, E.A. ja McClements, D.J., Lipid oxidation in emulsified food products, Teoksessa *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications. Volume 1, Understanding mechanisms of oxidation and antioxidant activity*, toim. McClements, D.J., Decker, E.A. ja Elias, R.J., Woodhead, Oxford 2010a, ss. 306-343.

Waharo, T., McClements, D.J. ja Decker, E.A., Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions, *Trends Food Sci. Technol.* **22** (2010b) 3-13.

Wang, X., De Vocht, M.L., De Jonge, J., Poolman, B. ja Robillard, G.T., Structural changes and molecular interactions of hydrophobin SC3 in solution and on a hydrophobic surface, *Protein Sci.* **11** (2002) 1172-1181.

Zeeb, B., Gibis, M., Fischer, L. ja Weiss, J., Crosslinking of interfacial layers in multilayered oil-in-water emulsions using laccase: Characterization and pH-stability, *Food Hydrocoll.* **27** (2012) 126-136.



Taulukko 1. Eri typetysajoilla typetetyn kaseiini-emulsion keskihajontojen (n=3) 600 sekunnin keskiarvot (n=31).

Typetysaika	Keskihajonnan keskiarvo
15 min	38043
35 min	37297
55 min	36664
75 min	36035

Taulukko 2. Typetyksen ja ilmastuksen vaikutus emulsion haihtumiseen tunnin kaasutuksen aikana (n=35).

Typetykskerta	Haihtuminen [%]			
	Pullo1	Pullo2	Pullo3	Ilmastettu
1	0,1	0,1	0,1	1,2
2	1,1	0,8	0,9	1,3
3	0,9	0,8	0,8	1,3
4	0,1	0,1	0,1	1,1
5	0,2	0,2	0,2	0,1
6	0,9	0,8	1,1	2,5
7	0,9	0,8	0,5	1,3
8	0,7	0,5	0,7	1,1
9	0,6	0,6	0,9	1,6
10	1,2	1,2	1,4	1,2
11	0,2	0,1	0,2	1,0
12	0,4	0,4	0,4	1,2
13	0,4	0,4	0,4	1,7
14	1,1	1,1	1,1	1,4
15	0,3	0,3	0,4	1,3
16	0,6	0,7	0,7	1,1
17	1,0	1,1	1,2	1,1
18	1,7	1,9	1,9	1,2
19	0,3	0,3	0,3	1,0
20	0,2	0,2	0,2	1,0
21	0,3	0,3	0,3	1,1
22	0,8	0,7	0,8	1,1
23	0,4	0,4	0,4	1,2
24	0,3	0,2	0,3	1,2
25	0,3	0,3	0,3	0,9
26	1,6	1,9	1,6	1,3
27	0,4	0,4	0,4	0,9
28	0,1	0,8	0,7	1,1
29	0,2	0,4	0,3	1,0
30	0,2	0,1	0,1	0,6
31	0,2	0,2	0,2	0,9
32	0,2	0,2	0,2	0,8
33	0,3	0,3	0,3	0,8
34	0,5	0,4	0,5	1,1
35	0,4	0,4	0,4	0,9
Ka	0,5	0,6	0,6	1,1

Aalto-yliopisto  
Kemian tekniikan korkeakoulu  
Puunjalostustekniikan kirjasto